

紫草乳膏提取工艺研究

曾祖平¹ 石佳² 王子君³ 王宏¹

(1 首都医科大学附属北京中医医院北京市中医研究所,北京,100010; 2 首都医科大学,北京,100013; 3 湖北中医药大学,武汉,430065)

摘要 目的:探讨紫草乳膏中药材提取工艺的优选方法。方法:采用分光光度法测定羟基萘醌总色素含量,采用高效液相色谱法(HPLC)测定羟基红花黄素 A 含量,以此作为评价指标,进行正交试验,优选药材提取工艺。结果:紫草、白芷的提取工艺为饮片粗粉加乙醇 4 倍量浸渍 48 h 后开始渗漉,溶剂用量为 10 倍;红花、当归的提取工艺为饮片用水浸泡 0.5 h 后,70 ℃温浸 2 次,60 min/次,第 1 次用水 12 倍量,第 2 次用水 10 倍量。结论:紫草乳膏提取工艺合理可行,为紫草乳膏的成型工艺研究及质量控制奠定基础。

关键词 紫草乳膏;提取工艺;羟基萘醌总色素;分光光度法;羟基红花黄素 A;高效液相色谱法;正交试验;含量测定

Study on the Extraction Process of Zicao Cream

Zeng Zuping¹, Shi Jia², Wang Zijun³, Wang Hong¹

(1 Beijing Institute of Traditional Chinese Medicine, Beijing Hospital of Traditional Chinese Medicine Affiliated to Capital Medical University, Beijing 100010, China; 2 Capital Medical University, Beijing 100013, China;

3 Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China)

Abstract Objective: To optimize the extraction process of Zicao cream. **Methods:** The contents of total pigment of hydroxynaphthalene were determined by spectrophotometry, and hydroxysafflor yellow A was determined by HPLC. The contents of total pigment of hydroxynaphthalene and hydroxysafflor yellow A were used as the indices for evaluation. Orthogonal test was applied to optimize the extraction process. **Results:** The extraction process of Arnebiae Radix and Angelicae Dahuricae Radix were found to be soaked with 95% alcohol for 48 h using coarse powders, and then percolated with 10 times amount of 95% alcohol; The extraction process of Carthami Flos and Angelicae Sinensis Radix were found to be soaked with water for 30 min, and then extracted by warm maceration at 70 ℃ with 12 times amount of water at the first time and 10 times amount of water at the second time, 60 min each time. **Conclusion:** The process is reasonable and feasible, and lays a foundation for the formation technology of Zicao cream and its quality standards.

Key Words Zicao cream; Extraction process; Total pigment of hydroxynaphthalene; Spectrophotometry; Hydroxysafflor yellow A; HPLC; Orthogonal test; Content determination

中图分类号:R284 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2018.11.051

紫草膏收载于《赵炳南临床经验集》,源自明代薛己《外科方》,由当归四两、紫草四两、白芷二两、红花二两组成,用香油二斤半和黄蜡八两炼膏去渣制成^[1]。方中紫草为君,凉血活血解毒;当归为臣,活血补血;红花活血化斑,凉血解毒,白芷散风消肿止痒,共为佐使,全方共奏凉血活血、解毒消肿之效,主治银屑病、丹毒等。紫草膏属油膏剂,药物经高温油炸,虽能得到一些脂溶性成分,但不利于某些热不稳定性成分及水溶性成分的提取^[2-3]。本研究根据药物中药效成分的理化性质进行适当提取,制定合理的提取工艺,为后续的乳膏剂成型工艺和质量控制奠定基础。

1 仪器与试药

1.1 仪器 1100 系列高效液相色谱仪(美国 Agi-

lent 公司);DU-800 分光光度计(BECKMAN COULTER);FW135 型倾斜式高速万能粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司);SK7210HP 超声波清洗机(上海科导超声仪器有限公司);XS205 超越系列专业型分析天平(METTLER TOLEDO);PB203-N 电子精密天平(上海梅特勒-托利多仪器有限公司);Milli-Q 纯水仪(MILLIPORE)。

1.2 试药 紫草膏处方饮片(北京杏林药业有限责任公司);左旋紫草素(批号 769-9803,中国食品药品检定研究院);羟基红花黄素 A(批号:11637-200905,中国食品药品检定研究院);甲醇、乙腈、磷酸为色谱纯,水为纯水仪制备,其他试剂为分析纯。

2 方法与结果

2.1 紫草、白芷提取工艺研究

基金项目:北京中医药科技发展资金项目(JJ2016-03)

作者简介:曾祖平(1963.03—),硕士,主任药师,副教授,研究方向:中药制剂研究及中药成分分析,Tel:(010)52176919,E-mail:zzp600@sohu.com

2.1.1 提取工艺路线设计 根据紫草、白芷中的药效成分的理化性质,采用乙醇作为提取溶剂。根据预实验结果,采用渗漉法提取紫草、白芷。

2.1.2 正交实验 根据渗漉法的操作要点,确定考察因素为药材粒度、浸渍时间、溶剂用量;根据预实验结果,设计 $L_9(3^4)$ 正交试验,以羟基萘醌总色素的转移率作为评价指标优化渗漉工艺参数,因素水平安排见表 1。

表 1 渗漉工艺因素水平

水平	因素		
	A(药材粒度)	B(浸渍时间,h)	C(溶剂用量,倍)
1	粗粉	16	6
2	中粉	24	8
3	细粉	48	10

按表 1 设定的试验条件,分别称取相应粒度的紫草粉 10 g 和白芷粉 5 g,混合均匀,装入筒形分液漏斗,加药粉总量 4 倍的 95% 乙醇浸渍相应时间,开始渗漉,并添加相应量溶剂,分别收集漉液于 250 mL 量瓶中,95% 乙醇定容至刻度,摇匀。精密吸取定容液 0.5 mL 于 10 mL 量瓶中稀释至刻度,作为供试品溶液。

2.1.3 线性关系考察 精密称取左旋紫草素(五氧化二磷减压干燥 22 h)0.0080 g 于 100 mL 量瓶中,用甲醇超声溶解后定容至刻度,得到 0.08 mg/mL 的左旋紫草素储备液。精密量取左旋紫草素储备液各 0.5,1.0,2.0,3.0,4.0 mL 于 5 个 10 mL 量瓶中,用甲醇稀释并定容至刻度,于 516 nm 测定吸光度,以吸光度为纵坐标,以浓度为横坐标,建立回归方程 $y = 23.141x + 0.008 (r^2 = 0.998)$,线性范围为 0.004 ~ 0.032 mg/mL。

2.1.4 专属性考察 取白芷最粗粉 5 g,按 2.1.2 项下 1 号实验条件制备紫草阴性对照液,进行扫描,结果 516 nm 无明显吸收,表明白芷对紫草中羟基萘醌总色素的测定无干扰。

2.1.5 稳定性考察 供试液在 0 ~ 5 h 之内,每隔 30 min 于 516 nm 测定吸收度,结果 $RSD = 2.02%$,说明供试液 5 h 内基本稳定。

2.1.6 精密度考察 同一供试液样品连续测定吸收度 6 次,结果 $RSD = 0.53%$,说明仪器精密度良好。

2.1.7 重复性考察 1 号渗漉液按 2.1.2 项下方法制备供试液,平行操作 6 份,于 516 nm 测定吸收度,结果 $RSD = 1.04%$,表明方法重复性良好。

2.1.8 加样回收率试验 于已知含量的 1 号渗漉

液中精密加入一定量的左旋紫草素储备液,平行操作 6 份,依法测定,结果平均回收率为 98.66%, $RSD = 1.23% (n = 6)$,符合要求。

2.1.9 样品测定 正交实验得到的 1 号-9 号供试液于 516 nm 下测定吸光度,根据标准曲线计算羟基萘醌总色素含量;根据药材的含量计算转移率。见表 2。

表 2 渗漉工艺正交试验结果

试验号	A	B	C	D	羟基萘醌总色素转移率(%)
1	1	1	1	1	91.86
2	1	2	2	2	95.02
3	1	3	3	3	99.98
4	2	1	2	3	79.90
5	2	2	3	1	82.57
6	2	3	1	2	85.31
7	3	1	3	2	93.89
8	3	2	1	3	91.95
9	3	3	2	1	92.28
K1	95.623 0	88.549 3	89.707 8		
K2	82.594 0	89.845 0	89.065 9		
K3	92.702 6	92.525 4	92.146 0		
R	13.029 0	3.976 1	3.080 2		

2.1.10 数据分析 对正交试验结果进行直观分析,可见影响转移率的因素依次为 A(药材粒度)、B(提取时间)、C(乙醇用量),最佳提取工艺是 $A_1B_3C_3$,即药材粗粉、10 倍量溶剂、浸渍 48 h。采用 SPSS 15.0 统计软件进行方差分析,显示因素 A 即药材粒度对转移率差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 渗漉工艺正交实验方差分析结果

方差来源	离差平方和	自由度	均方	F	P
A	0.032	2	0.016	28.55	0.034
B	0.003	2	0.001	2.510	0.285
C	0.002	2	0.001	1.612	0.383
误差	0.001	2	0.001		

2.1.11 紫草白芷渗漉工艺验证试验 取紫草粗粉 10 g 和白芷粗粉 5 g,共 3 份,混合均匀,分别装入渗漉筒中,加 95% 乙醇 60 mL,浸渍 48 h,开始渗漉,并添加 95% 乙醇 150 mL,收集漉液于 250 mL 量瓶中,定容至刻度,摇匀。精密吸取定容液 0.5 mL 于 10 mL 量瓶中,定容至刻度,摇匀。分别于 516 nm 下测定吸光度,结果羟基萘醌总色素的转移率平均为 98.89% ($RSD = 1.00%$),表明优选出的条件具有重现性。

2.2 红花、当归提取工艺

2.2.1 提取工艺路线设计 根据紫草膏的功效,结合药效学研究结果及药效成分理化性质设计提取工艺路线。以水为溶媒,红花、当归饮片浸泡 30 min 后提取 2 次^[4-5]。正交试验的考察因素设计了溶剂用量(A)、提取温度(B)、提取时间(C)三因素,以提取液中羟基红花黄素 A 含量为考察指标,设计 $L_9(3^4)$ 因素水平见表 5。

表 5 水提工艺因素水平

水平	因素		
	溶剂用量 A(倍)	温度 B(°C)	提取时间 C(min)
1	14 + 12	室温	20
2	12 + 10	50	40
3	10 + 8	70	60

2.2.2 正交试验 红花 2 g/份、当归 4 g/份,共 9 份,精密称定,置具塞锥形瓶中,按照表 5 中正交试验安排进行试验,加入第一次溶剂后浸泡 0.5 h 后提取。每次提取液放冷,滤过,合并 2 次滤液,转移至 250 mL 量瓶中,纯净水定容,摇匀。

2.2.3 HPLC 色谱条件 Kromasil 100-5C18(5 μm , 150 mm \times 4.6 mm) 色谱柱,甲醇-乙腈-0.7% 磷酸水溶液(26:2:72)作为流动相,流速为 1.0 mL/min,检测波长为 403 nm;柱温为室温,理论塔板数羟基红花黄素 A 应不低于 3 000^[6]。

2.2.4 对照品溶液制备 精密称取红花黄素 A0.0098 g 于 50 mL 量瓶中,纯净水溶解并稀释至刻度,摇匀,即得。

2.2.5 供试品溶液制备 分别精密量取上述 9 个正交实验样品溶液 0.5 mL 于 25 mL 容量瓶中,纯净水定容,摇匀,0.45 μm 微孔滤膜滤过,续滤液作为供试品溶液。

2.2.6 线性关系考察 分别精密量取对照品溶液 1.0,2.0,3.0,4.0,5.0 mL 于 10 mL 量瓶中,用纯净水稀释并定容至刻度,摇匀,滤过,按上述色谱条件进样各 5 μL ,测定,以峰面积为纵坐标,以羟基红花黄素 A 质量为横坐标,建立回归方程 $y = 3\,314.8x - 39.257$ ($r^2 = 0.9997$),线性范围为 0.098 ~ 0.98 μg 。

2.2.7 精密密度试验 同一供试液连续 6 次进样,羟基红花黄素 A 峰面积 RSD 为 1.01%,表明仪器精密密度良好。

2.2.8 重复性试验 同一份正交试验提取液,按(3)项下方法制备供试品溶液,共 6 份,按(1)项下色谱条件进样 5 μL ,测定,结果羟基红花黄素 A 含量的 $RSD = 1.43\%$,表明方法重复性良好。

2.2.9 稳定性试验 取同一供试液,每隔 1 h 进样

测定 1 次,连续测定 6 h,结果羟基红花黄素 A 峰面积 $RSD = 1.52\%$ ($n = 7$),表明供试液中羟基红花黄素 A 在 6 h 内基本稳定。

2.2.10 回收率试验 精密吸取已知含量的正交试验 3 号提取液 0.3 mL,共 6 份,置 25 mL 量瓶中,分别精密加入羟基红花黄素 A 对照品溶液各 0.1 mL,纯净水定容,摇匀,滤过,进样 5 μL 测定,计算回收率,结果平均回收率为 99.64% ($RSD = 1.49\%$)。

2.2.11 供试液测定 9 份供试品溶液按 2.2.3 项下色谱条件分别进样 5 μL ,测定。见表 6。色谱图见图 1。

表 6 水提工艺正交试验结果

试验号	A	B	C	D	羟基红花黄素 A(%)
1	1	1	1	1	1.0352
2	1	2	2	2	1.2824
3	1	3	3	3	1.4582
4	2	1	2	3	1.1153
5	2	2	3	1	1.3082
6	2	3	1	2	1.3322
7	3	1	3	2	1.1495
8	3	2	1	3	1.1403
9	3	3	2	1	1.3146
K1	3.7758	3.3001	3.5078		
K2	3.7558	3.7309	3.7124		
K3	3.6045	4.1051	3.9159		
R	0.1714	0.8050	0.4081		

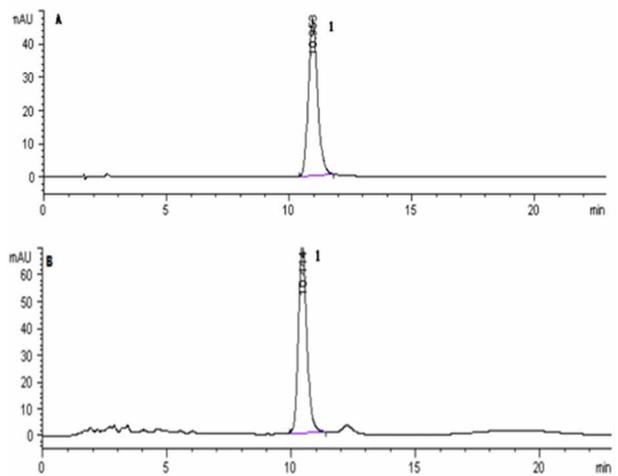


图 1 HPLC 图谱

注:A. 对照品溶液;B. 供试品溶液;1. 羟基红花黄素 A

2.2.4 数据处理及分析 影响提取因素的顺序:B > C > A;最佳提取条件为 $A_1B_3C_3$,即:饮片浸泡 30 min 后,70 °C 温浸 2 次,60 min/次,第 1 次用 14 倍溶剂量,第 2 次用 12 倍溶剂量。方差分析显示,因素 B 对提取影响差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 7。

2.2.5 验证实验 直观分析和方差分析显示,因素

A对提取工艺影响最小,考虑到后续操作的方便,同时验证 $A_1B_3C_3$ 和 $A_2B_3C_3$ 。取红花2g/份,当归4g/份,共6份,精密称定,置具塞锥形瓶中,按 $A_1B_3C_3$ 和 $A_2B_3C_3$ 条件各操作3份,按2.2.3制备供试品溶液并测定。结果两工艺提取的羟基红花黄色素A含量分别为1.51% ($RSD = 1.86\%$)和1.49% ($RSD = 1.76\%$),表明工艺具有重现性,两工艺得到的羟基红花黄色素A含量差异无统计学意义。考虑到 $A_2B_3C_3$ 在后续浓缩过程中可减少浓缩时间,减少有效成分损失的可能,故确定提取条件为 $A_2B_3C_3$,即饮片浸泡30 min后,70℃温浸2次,60 min/次,第1次溶剂用量为药材质量的12倍,第2次为10倍。

表7 水提工艺正交实验方差分析结果

方差来源	离差平方和	自由度	均方	F	P
A	0.006	2	0.003	3.117	0.243
B	0.108	2	0.054	57.609	0.017
C	0.028	2	0.014	14.789	0.063
误差	0.002	2	0.001		

3 讨论

紫草中主要药效成分为蒽醌类色素,脂溶性强,易溶于石油醚等有机溶剂,可溶于乙醇^[7];参考考虑到生产实际情况,采用95%乙醇提取^[8-9]。白芷中治疗银屑病的有效成分欧前胡素、异欧前胡素也具有脂溶性,溶于乙醇,与紫草一起采用95%乙醇提取^[10]。

紫草中主要药效成分为羟基萘醌衍生物,具有脂溶性和热不稳定性,高于60℃可使成分大部分破坏,因此提取温度为提取关键条件,提取方法选择时考察了渗漉法和温浸法,以95%乙醇为提取溶剂,比较两者对药效成分的保留程度。结果渗漉法提取的羟基萘醌总色素含量高于温浸法,因此采用渗漉法提取紫草、白芷。

红花具有扩张血管,增加血流量及改善微循环、抗凝血及抑制血小板聚集、镇痛及抗炎作用,这些作用与紫草膏的功效吻合;红花的有效成分主要集中于水溶性的红花黄色素。当归水煎液对多种致炎剂引起的急性毛细管通透性增加、组织水肿及慢性炎症反应损伤均有显著抑制作用,且能抑制炎症反应后期肉芽组织增生;对豚鼠Forssman皮肤血管炎及大鼠反向皮肤过敏反应具有显著的抑制作用,且能明显抑制大鼠波动Arthus反应,提示当归对II、III型变态反应炎症反应也有抑制作用^[11-15]。因此,以水作为红花、当归的提取溶剂。

红花、当归药材的主要药效成分羟基红花黄色

素A、阿魏酸对热不稳定,较长时间的加热会造成有效成分分解,从而降低药效^[16]。因此正交试验中考察了提取温度。预试验结果表明,提取时温度应控制在70℃以下。故不用加热回流法提取,而采用水浴温浸法。

白芷作为佐使药,试验中采用薄层色谱法控制其质量。实验结果显示,紫外灯(365 nm)下,验证实验得到的渗漉液中,在与白芷对照药材和欧前胡素对照品色谱相应的位置显相同颜色的荧光斑点。说明紫草白芷渗漉液中含有欧前胡素等白芷中的多种成分,提取方法合理可行。

红花当归的提取正交实验中,对当归中含有的阿魏酸也进行了HPLC测定。9个试验中阿魏酸含量在0.027%~0.064%之间,极差分析和方差分析得到的结论与羟基红花黄色素A的结论一致。

参考文献

- [1]北京中医医院编.赵炳南临床经验集[M].北京:人民卫生出版社,2006:347-348.
- [2]郭红军,孔焕宇,马长华.紫草油膏中的化学成分研究[J].时珍国医国药,2006,17(2):153-154.
- [3]王宏,彭冰,李萍,等.紫草闪式提取醇提物HPLC指纹图谱的研究[J].中国实验方剂学杂志,2014,20(2):74-77.
- [4]初阳,宋洪涛,陈大为,等.红花黄色素提取工艺的研究[J].中草药,2006,37(8):1161-1164.
- [5]朱文明,潘见,金日生,等.正交试验法优选红花中红花黄色素提取工艺[J].安徽大学学报:自然科学版,2008,32(1):85-89.
- [6]国家药典委员会.中华人民共和国药典:2015年版一部[S].北京:中国医药科技出版社,2015:151.
- [7]匡海学.中药化学[M].北京:中国中医药出版社,2011:262.
- [8]周健,王汝兴,赵桂琴.紫草总色素的提取工艺[J].承德医学院学报,2015,32(3):233-234.
- [9]马琴国,陈耀章,张承军,等.均匀设计法优选室温下紫草萘醌类化合物提取工艺[J].中国实验方剂学杂志,2014,20(12):24-26.
- [10]刘晓晔,王佩.白芷香豆素类成分的提取及大孔树脂纯化的工艺研究[J].中华中医药杂志,2015,33(2):438-441.
- [11]李玮玮,陈路,刘春慧.红花黄色素对脑血管疾病的机制及药理作用研究进展[J].世界最新医学信息文摘,2016,16(100):71-72,78.
- [12]邵礼梅,许世伟,苏玉娟.红花药物分析、化学成分及现代药理研究进展[J].中医药信息,2017,34(2):123-125.
- [13]史敏,陈雷,龚佳佳,等.红花黄色素的研究进展[J].世界最新医学信息文摘:连续型电子期刊,2018,18(8):20,29.
- [14]李曦,张丽宏,王晓晓,等.当归化学成分及药理作用研究进展[J].中药材,2013,36(6):1023-1028.
- [15]刘如秀,刘宇,汪艳丽,等.当归的药理作用[J].西部中医药,2014,27(11):153-156.
- [16]盛芳芳,刘新,林於.舒胸片中川芎和红花提取工艺优化[J].光谱实验室,2013,30(5):2379-2384.