

红花中羟基红花黄色素 A 的提取工艺及其热稳定性研究

★ 罗晶¹ 黄宇玫² 曾文雪¹ (1. 江西中医学院 南昌 330004; 2. 南昌大学科技学院 南昌 330006)

摘要:目的:优化红花中羟基红花黄色素 A 的提取工艺条件及其的热稳定性。方法:以羟基红花黄色素 A 的含量为指标,采用单因素和正交实验方法,对提取温度、浸取时间、溶剂用量进行考察;通过测量于不同温度下保温不同时间的该成分的吸光度,考察其的热稳定性。结果:最佳提取工艺为:分别加 20 倍量的水提取 2 次,在 40℃ 下,2 次浸取时间分别为 12 h 和 4 h,过滤,合并滤液;且羟基红花黄色素 A 不易在高温条件下提取或保存,在低温下具有一定的稳定性。结论:该研究方法合理方便,并可为羟基红花黄色素 A 提取及保存提供实验依据。

关键词:红花;羟基红花黄色素 A;提取工艺;热稳定性

中图分类号:R 284.2 文献标识码:A

Study on Optimum Extraction and Thermostability of Asafflor Yellow-A in *Carthamus Tinctorius* L.

LUO Jing¹, HUANG Yu-mei², ZENG Wen-xue¹

1. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330006;
2. Nanchang University college of science and technology, Nanchang, 330006

Abstract: Objective: To study the optimum extraction and thermostability of Asafflor yellow-A. Methods: Referring to the content of Asafflor yellow-A, single factor and orthogonal design was applied, the extraction temperature, the time of the extraction and the solvent consumption were to inspect; and by measuring the constituents of absorbance at different temperatures at different times to inspect its thermostability. Result: The optimum extraction as follows: adding 20 times of water extracted 2 times respectively, in 40℃, extracted 12h, the other times extracted 4 h, filtered, combined filtrate. Conclusion: The method was reasonable and convenient, and to offer experimental basis for Asafflor yellow-A extraction and preservation.

Key words: *Carthamus tinctorius* L.; Asafflor yellow-A; extraction technology; thermostability

红花(*Carthamus tinctorius* L.)为菊科植物红花的管状花,具有活血通经、祛瘀镇痛的功效,是传统的活血化瘀类中药^[1]。中医认为红花味辛,微苦,性温,归心,肝经,是活血通络,去瘀止痛之良药,为传统而又珍贵的中药^[2]。现代药理研究表明它对心血管系统有广泛而显著的作用,其中羟基红花黄色素 A (Assafflor yellow A),属于黄酮类化合物,为红花中活血化瘀作用的主要有效成分^[3,4]。本研究采用单因素和正交实验方法,对红花药材的提取方法,及提取条件进行了考察,得出最佳提取条件,同时又对羟基红花黄色素 A 热稳定性进行了考察。

1 仪器、材料与试剂

药物分析紫外分光光度测定仪 (SHIMADZU UV-1700); DIONNEX 高效液相色谱仪 (P680 HPLC Pump; ASI-100 Automated Sample Injector; UVD170U; Ther-mostatted Column Compartment TCC-100); 电子分析天平 (SGHANGPING FA1104); 流动相所用乙腈 (色谱纯)、水 (重蒸水); 其余试剂为分析纯; 红花, 购于成都五块石药材市场。经江西中医学院生药教研室鉴定, 符合《中国药典》2005 年版一部红花项下的相关规定。羟基红花黄色素 A 对照品为中国药品生物制品检定所提供 (批号 111637-

200301),供含量测定用,使用前置硅胶干燥器中干燥至恒重。

2 提取方法与结果

2.1 羟基红花黄色素 A 的测定

2.1.1 色谱条件 色谱柱:Kromasil ODS-1 (250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:乙腈-0.5%磷酸水溶液梯度洗脱;流速:1.0 ml/min;检测波长:342 nm;柱温:40℃;进样量:5 μl。

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取羟基红花黄色素 A 2 mg,加甲醇溶解定容至 10 ml,摇匀,即得。

2.1.3 供试品溶液的制备 称取红花药材 20 g,置于密闭容器内。加蒸馏水 400 ml,室温放置 12 h,抽滤,定容至 400 ml,精密量取 2 ml 至 10 ml 容量瓶,蒸馏水定容至刻度,待测定含量。

2.1.4 方法学考察 (1)线性关系考察。精密吸取羟基红花黄色素 A 对照品溶液 2、4、6、8、10 μl 进样,记录色谱图,以峰面积积分值(A)对对照品溶液进样量(C)进行线性回归,回归方程为: $A = 10.982C + 2.4845$;相关系数 $r = 0.9998$,结果表明羟基红花黄色素 A 在 0.23~1.30 mg/ml 之间线性关系良好。

(2)精密度考察。精密吸取羟基红花黄色素 A 对照品溶液重复进样测定 6 次,结果 RSD 为 0.06%,表明方法精密度良好。

(3)重现性试验。取样品 6 份,按样品溶液制备后,取 5 μl 进样,测定并计算每份供试品中羟基红花黄色素 A 的含量。结果表明,RSD 为 0.78%,方法重现性好。

(4)加样回收率试验。精密称取已知羟基红花黄色素 A 含量的样品 6 份,精密加入羟基红花黄色素 A 对照品溶液 2 ml,按样品测定项下操作,得平均回收率为 99.8%,RSD = 1.3%。

2.1.5 供试品的测定 分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液各 5 μl,注入液相色谱仪,测定羟基红花黄色素 A 的含量,即得图谱。见图 1,2。

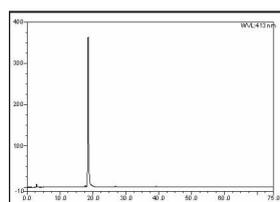


图1对照品HPLC图谱

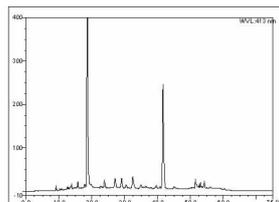


图2供试品HPLC图谱

2.2 提取工艺及影响因素的考察

2.2.1 提取方法的考察 据报道^[5],红花药材的主要有效成分红花黄色素为不耐热、水溶性成分,故本实验以水为溶媒进行提取。考察浸提时间、溶媒用

量,浸提次数对红花提取效果的影响。

2.2.2 浸提时间的考察 称取红花药材 3 份,每份 20 g,置于密闭容器内。分别加蒸馏水 400 ml,每 3 h 振摇一次,分别在室温放置 4、8、12、16 h,分别抽滤后定容至 400 ml,分别精密量取 2 ml 至 10 ml 容量瓶,蒸馏水定容至刻度,测定含量。

2.2.3 溶媒用量的考察 称取红花药材 3 份,每份 20 g,置于密闭容器内。分别加蒸馏水 200、300、400 ml,每 3 h 振摇一次,分别在室温放置 12 h,分别抽滤后定容至 400 ml,分别精密量取 4 ml 至 10 ml 容量瓶,蒸馏水定容至刻度,测定含量。

2.2.4 浸提次数的考察 称取红花药材 3 份,每份 20 g,置于密闭容器内。第一份浸提 1 次:加蒸馏水 400 ml,每 3 h 振摇一次,在室温放置 12 h,抽滤后定容至 400 ml;第二份浸提 2 次:第一次加蒸馏水 400 ml,浸提 12 h,过滤后再加蒸馏水 400 ml,浸提 4 h,过滤,两份样品分别定容至 400 ml;第三份浸提 3 次:第一次加蒸馏水 400 ml,浸提 12 h,过滤后再加蒸馏水 400 ml,浸提 4 h,过滤,然后再加蒸馏水 400 ml,3 份样品分别定容至 400 ml。分别精密量取上述样品容量瓶,蒸馏水定容至刻度,测定含量。

2.2.5 供试品含量测定及结果 将各供试品注入液相色谱仪,对照品羟基红花黄色素 A 的峰面积为 147.531,计算供试品中含量羟基红花黄色素 A 结果如表 1。

表1 各提取方案中羟基红花黄色素 A 含量测定结果

提取方案	方法	羟基红花黄色素 A 含量 /ml·kg ⁻¹	RSD(%)
不同提取方法	温浸法	0.378	1.87
	冷浸法	0.789	1.71
	渗漉法	0.526	1.95
不同浸取时间	4h	0.279	1.67
	8h	0.338	1.91
	12h	0.792	1.01
	16h	0.799	1.97
不同用量提取	10倍	0.561	1.67
	15倍	0.631	1.81
	20倍	0.785	1.03
不同提取次数	1	287.698	1.41
	2	①290.459 ②75.795	1.97 1.57
	3	①291.677 ②89.356 ③11.190	1.81 1.03 1.97

由上表可知,通过冷浸法,冷浸药材 12 h,羟基红花黄色素 A 的含量已达到平衡,溶媒为 20 倍时,羟基红花黄色素 A 的提取率最高,提取两次已经基本提取完全。

2.2.6 正交试验 由单因素实验结果可知,确定提

取两次,而影响羟基红花黄色素 A 提取的因素主要有:提取温度、浸取时间、溶剂用量。故提取温度选为 20、60、100 ℃;浸取时间选为 8、12、16 h;溶剂用量选为 10、20、30 倍;设计正交实验 $L_9(3^4)$ 表 2,以羟基红花黄色素 A 提取率为考察指标,找出最佳提取工艺。

表 2 因素水平表

水平	A 提取温度 /℃	B 浸取时间 /h	C 溶剂用量 /倍
1	20	8	10
2	40	12	20
3	60	16	30

试验时,取 10 g 红花粉末,按表 2 进行正交试验,测定吸光度值,计算羟基红花黄色素 A 提取率。结果如表 3 所示。表 4 为正交试验方差分析表。

表 3 正交试验结果(n=3)

试验号	A 提取温度 /℃	B 浸取时间 /h	C 溶剂用量 /倍	D 误差	羟基红花黄色素 A 提取率(%)
1	1	1	1	1	76.05
2	1	2	2	2	90.47
3	1	3	3	3	85.89
4	2	1	2	3	82.55
5	2	2	3	1	92.32
6	2	3	1	2	90.86
7	3	1	3	2	79.18
8	3	2	1	3	91.79
9	3	3	2	1	90.83
K1	84.137	79.260	86.233	86.400	
K2	88.577	91.527	87.950	86.837	
K3	87.267	89.191	85.797	86.743	
R	4.440	12.267	2.153	0.437	

表 4 正交试验方差分析表

方差来源	偏差平方和	自由度	F 值	显著性
A	31.227	2	95.508	*
B	254.587	2	803.114	*
C	7.774	2	24.524	*
D	0.32	2		*

注: $F_{0.05(2,2)}=19$, * 表示有显著性。

由表 3,4 的结果可以看出,三因素对提取效果影响的大小顺序是:B>A>C,即浸取时间对羟基红花黄色素 A 提取率的影响最大且三因素影响显著($P<0.05$)。

根据直观分析和方差分析的结果,确立红花黄色素的提取工艺为 $A_2B_2C_2$,即红花药材,分别加 20 倍量的水提取 2 次,在 40 ℃下,2 次浸取时间分别为 12 h 和 4 h,过滤,合并滤液。正交试验结果与单因素条件下的实验结果相吻合。

2.2.7 提取工艺的验证 按羟基红花黄色素 A 提取率最高正交试验号 5 和正交试验优化的提取条件进行验证实验(n=3),结果羟基红花黄色素 A 提取

率分别为 92.32%、93.27%,RSD 均 <2%。

3 温度对红花黄色素稳定性影响

由光谱图可知,羟基红花黄色素 A 水溶液在 401 nm 处吸收较强。说明在 401 nm 波长下,测定

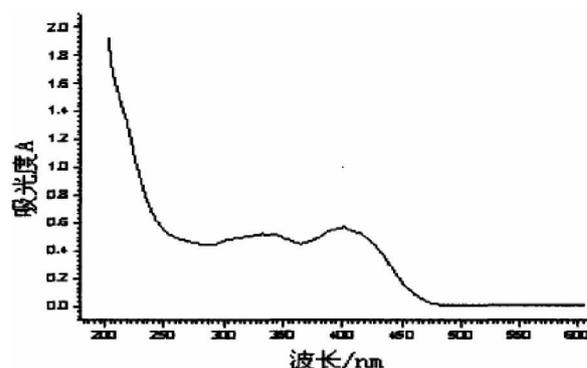


图 3 紫外-可见吸收光谱图

水溶液中的羟基红花黄色素 A 含量最为可靠。

羟基红花黄色素 A 不稳定,遇热易分解。配制 0.01 mg/ml 羟基红花黄色素 A 水溶液,于不同温度下保温不同时间,考察羟基红花黄色素 A 的热稳定性(以保存率表示)。根据公式保存率 $R\% = At/A_0 \times 100\%$ (A_0 为羟基红花黄色素 A 溶液开始 $t=0$ 时吸光度,At 为羟基红花黄色素 A 溶液经过 t 分钟的吸光度),计算各自保存率。

表 2 羟基红花黄色素热稳定性研究结果

温度/℃	保存率(%)				
	0min	10min	20min	30min	60min
20	100	99.93	99.85	99.82	99.78
40	100	98.65	98.01	97.22	95.31
60	100	97.32	95.79	94.89	92.45
80	100	95.78	94.33	93.17	90.26
100	100	93.21	92.31	90.67	85.78

由表 2 实验结果可知:在 100℃加热 60 min,羟基红花黄色素 A 的保存率为 85.8%,下降 15%;20℃放置 60 min 羟基红花黄色素 A 的保存率为 99.7%,基本保持不变。这些结果说明,随温度升高和加热时间的延长,羟基红花黄色素 A 发生了热降解,保存率也随着下降。因此羟基红花黄色素 A 不易在高温条件下提取或保存,在低温下具有一定的稳定性。

3 讨论

(1)在研究红花的提取工艺时,参考了大量的文献,由于羟基红花黄色素 A 是水溶性的物质,考虑到经济节约,污染小的因素,直接考察的用水作溶媒,没有考察其他溶媒的提取效果的比较。

(2)目前关于红花中羟基红花黄色素 A 的含量测定方法主要有化学法,分光光度法和薄层层析法。

白头翁提取物体外抗结核杆菌作用的实验研究*

★ 王淑英^{1**} 刘萌萌² 吴银萍¹ 岳苏华¹ (1. 河南科技大学医学院药理教研室 洛阳 471000; 2. 洛阳疾病控制预防中心结研所 洛阳 471003)

摘要:目的:观察白头翁提取物体外对结核杆菌的作用。方法:采用新鲜的人型结核分枝杆菌标准菌株(H37RV)、多药耐药以及速生结核菌株,分别接种于含有不同浓度白头翁正丁醇提取物、空白对照和阳性对照的结核菌培养基,观察结核分枝杆菌的生长情况。结果:空白对照组菌落生长情况正常,白头翁提取物组(1:10~1:20)均对新鲜结核菌和速生菌生长有抑制作用,其中白头翁提取物1:10对多药耐药菌株到培养终止期(40 d)仍无细菌生长。经恢复培养40 d均无结核菌生长。结论:一定浓度的白头翁提取物在体外有抗结核菌的作用,且有不可恢复的杀灭作用。

关键词:白头翁提取物;结核分枝杆菌;体外试验

中图分类号:R 285.5 文献标识码:A

Experimental study of effects of Chinese bulbul extracts againsting Mycobacterium Tuberculosis in Vitro

WANG Shu-ying¹, LIU Meng-meng², WU Yin-ping¹, YUE Su-hua¹

1. Department of pharmacology in medical college of Henan University of Science and Technology, Luoyang 471000;
2. Luoyang centers for disease control and prevention, Luoyang 471003

Abstract: Objective: To observe Chinese bulbul extract againsting Mycobacterium Tuberculosis in Vitro. Method: Mycobacterium Tuberculosis(H37RV), multidrug-resistant Tuberculosis and burgeoning Tuberculosis were respectively incubated in culture media with various content of the Chinese bulbul extract, blank control and positive control of TB medium. The results of growth of M. Tuberculosis

化学法只能作为一种定性方法,不能用于红花的质量考察;分光光度法是测定药材中总黄色素和总红色素;薄层层析法因各种因素的影响误差较大,其准确度和精密度难以令人满意,而且其中所得到的斑点并非单体化合物的特征斑点。并且2005版《中国药典》对于红花黄色素A的测定方法用的就是高效液相色谱法,所以参照药典决定用高效液相色谱法对于发酵后红花进行含量测定。

(3)羟基红花黄色素A虽具有较高的安全性、着色时色调比较自然等优点,但其稳定性较差不易在高温条件下提取或保存,在低温下具有一定的稳定性使其应用受到很大限制,因此必须采取有效措施来提高其稳定性。目前除了采用上述的提取方法对色素进行提取以提高色素稳定性外,主要的措施还有:加入稳定剂、抗氧化剂、金属离子封锁剂或天

然色素的改性。为了使红花黄色素在医药以及食品工业中得到更广泛的应用,我们在前人研究的基础上还需对其稳定性进行进一步研究。

参考文献

- [1] 江苏新医学院. 中药大辞典[M]. 上海:上海科学技术出版社, 1999:992.
- [2] 张贵君,徐国君. 常用中药鉴定大全[M]. 哈尔滨:黑龙江科学技术出版社,1993:378.
- [3] 李中原,涂秀华. 红花黄色素的药理研究进展[J]. 中药新药与临床药理,2005,16(2):153-156.
- [4] 杨志福,梅其柄,蒋永培. 红花有效成分及药理作用[J]. 西北药学杂志,2001,16(3):131-133.
- [5] 张戈,郭美丽,等. 红花的化学成分研究[J]. 第二军医大学学报,2002,23(1):109-110.

(收稿日期:2008-11-19)

* 基金项目:河南省科技攻关项目(62530007)

** 作者简介:王淑英(女),1965-,学士,药理学副教授。E-mail:ylwsy@126.com。Tel:13693790490