

· 中药工业 ·

正交试验优化裸花紫珠水提取工艺 及外用止血作用的评估[△]

张仲^{1,2a}, 罗贤强^{2a}, 周金娜², 周小芳², 黄明浩², 张俊清^{1,2*}, 罗喻超^{2*}

(1. 海南省热带药用植物研究开发重点实验室, 海南 海口 571199;

2. 海南医学院药学院, 海南 海口 571199)

[摘要] 目的: 优化裸花紫珠茎叶水提取的工艺及初步考察水提取物的外用止血作用。方法: 以浸膏得率和毛蕊花糖苷得率为评价指标, 考察浸泡时间、加水倍量、提取时间和提取次数等因素, 采用正交试验优选最佳水提取工艺。采用家兔耳缘静脉出血模型, 外用0.5、1.0、2.0 g·mL⁻¹ (按生药量计) 三种浓度的水提取物, 以出血量和出血时间为指标, 评价裸花紫珠的外用止血效果。结果: 裸花紫珠最佳水提取工艺为浸泡时间2 h, 提取次数3次, 加水倍量为12、10、10, 每次提取时间为1 h; 与空白组相比, 裸花紫珠低、中、高剂量组出血量均显著减少 ($P < 0.01$), 并且高剂量组相较空白组出血时间显著缩短 ($P < 0.01$)。结论: 优选出的水提取工艺简单可行, 且裸花紫珠水提取物有一定的外用止血作用, 有进一步开发为外用止血贴的潜力。

[关键词] 裸花紫珠; 提取工艺; 毛蕊花糖苷; 止血; 外用

Optimization of Water Extraction Process of *Callicarpa nudiflora* by Orthogonal Design and Evaluation of Hemostasis Effects in External Use

ZHANG Zhong^{1,2a}, LUO Xian-qiang^{2a}, ZHOU Jin-na², ZHOU Xiao-fang²,HUANG Ming-hao², ZHANG Jun-qing^{1,2*}, LUO Yu-chao^{2*}

(1. Hainan provincial key laboratory of R&D on tropical herbs, Haikou 571199, China;

2. School of Pharmacy, Hainan Medical University, Haikou 571199, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize the water extraction process of stem and leaves of *Callicarpa nudiflora* and preliminarily evaluate hemostasis effects of water extract in external use. **Methods:** The optimum extraction process was optimized by orthogonal experiment with the yield of extraction and the extraction rate of acteoside as evaluation indicator. The influence of soak time, water addition, extraction time, and extraction time were investigated. The bleeding wound model of rabbit ear vessels was established and three concentrations of water extract (0.5, 1.0, 2.0 g·mL⁻¹, in terms of crude drug) were external used respectively. The hemostasis effects were evaluated with the bleeding volume and the bleeding time as evaluation indexes. **Results:** The optimized water extract craft of *C. nudiflora* was: the soak in water for 2 h, the extraction time was 3, with 12, 10, 10 times water in sequence, and each extraction time was 1h. Compared with control group, the amount of bleeding decreased significantly in each dose group ($P < 0.01$), and bleeding time also decreased significantly in high dose group ($P < 0.01$). **Conclusion:** The optimized extraction process is simple and practicable, the water extract of *C. nudiflora* has certain hemostasis activity in external use and there is potential for further development of external hemostatic patches.

[Keywords] *Callicarpa nudiflora*; extraction process; acteoside; hemostasis; external use

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.20170829004

裸花紫珠 *Callicarpa nudiflora* Hook. et Arn 为马鞭草科紫珠属 (*Callicarpa* Linn.) 植物, 又名赶风柴、节节红、百花茶、饭汤叶、亚赛凡等^[1], 主要分布

于我国海南, 广西, 广东等地, 裸花紫珠是海南常用黎药材^[2]。主要分布于白沙, 五指山琼中等地。裸花紫珠作为药材四季均可收获, 取裸花紫珠的地

[△] [基金项目] 海南省自然科学基金(817136); 海南省自然科学基金创新研究团队项目(709159280056); 海南医学院大学生创新创业训练计划项目(HYCX2015034)

* [通信作者] 张俊清, 教授, 研究方向: 药用资源开发利用; E-mail: jqzhang2011@163.com
罗喻超, 实验师, 研究方向: 分子药理学研究; E-mail: 55685711@qq.com

上干燥部分,阴干,去除杂质用药,具有抗菌、消炎解毒、收敛止血、祛风除湿的功效,临床上用于急性传染性肝炎、化脓性炎症、消化道出血等症,外用常用于治烧伤、烫伤及外伤出血等。现代研究表明,裸花紫珠主要含有黄酮、鞣质、萜类和酚类等成分^[3-4],其中的苯乙醇苷类化合物毛蕊花糖苷(acteoside, AS)有显著缩短活化部分凝血活酶时间(APTT)作用,提示裸花紫珠可能是通过影响内源性凝血途径来发挥止血作用,其中毛蕊花糖苷在药材中的含量很高,可能是裸花紫珠止血的主要活性成分^[5]。

市场调查发现,目前市场上裸花紫珠制剂已有片剂、胶囊剂、合剂、分散片、栓剂和阴道片剂等剂型^[6],但是缺少用于止血的外用制剂,研制裸花紫珠外用止血贴不仅可以填补市场的空缺,还能通过贴剂的特点更好发挥裸花紫珠的止血效果。本论文通过正交试验对裸花紫珠的水提取工艺进行优化,并进行了工艺验证实验。用最佳提取工艺所获得的水提取物进行了外用止血实验,对止血的效果进行了评估。这些都为将来裸花紫珠止血贴的研发提供了基础。

1 材料与仪器

1.1 动物

清洁级家兔,购买于广东省医学实验动物中心,合格证号:SDWA-44060506-0403-20170330-00001,雌雄各半,体重2.2~2.5 kg。

1.2 药物及试剂

裸花紫珠于2016年5月采自海南省白沙县,经海南医学院药学院田建平教授鉴定为马鞭草科紫珠属植物裸花紫珠 *Callicarpa nudiflora* Hook. et Arn;吸水垫(7.5 cm×7.5 cm×0.1 cm)购买于优玖责任有限公司;云南白药创可贴(批号:PJE1628);甲醇、醋酸、无水乙醇均为分析纯,购自广州化学试剂厂,乙腈为色谱纯,水为超纯水。

1.3 仪器

北京赛多利斯仪器系统有限公司 SO9001 型电子天平;上海博讯实业有限公司医疗设备厂 GXZ-9240 型数显鼓风干燥箱;上海亚荣生化仪器厂 RE-52AA 型旋转蒸发器。Shimadzu LC-2010AHT 高效液相色谱仪(配有紫外检测器,自动进样器,LC solution 色谱工作站)。

2 方法与结果

2.1 裸花紫珠提取工艺的考察

2.1.1 浸膏得率的测定 精密量取滤液 25 mL,置已干燥至恒重的蒸发皿中,在水浴上蒸干后,于 105 ℃干燥 24 h,迅速转移至干燥器中冷却 0.5 h,迅速精密称定质量,计算浸膏得率。计算浸膏得率。

$$\text{浸膏收率}(\%) = \frac{\text{浸膏重}(\text{g})}{\text{生药}(\text{g})} \times 100\% \quad (1)$$

2.1.2 毛蕊花糖苷的测定 依照本实验室王勇等^[7]建立的色谱条件:Luna C₁₈ 色谱柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相乙腈-0.1%醋酸水溶液(15:85),流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长 332 nm,柱温 30 ℃。精密称取毛蕊花糖苷对照品 25.8 mg,置 25 mL 量瓶中,加 50% 甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,配成毛蕊花糖苷浓度为 1.032 mg·mL⁻¹ 的标准品溶液。然后分别吸取一定体积的该溶液置于 25 mL 量瓶中,加 50% 甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,分别稀释成 6 种浓度分别为 0.103 2、0.206 4、0.412 8、0.516 0、0.619 2、0.825 6 mg·mL⁻¹ 的对照品溶液。各浓度的溶液分别进样 2 μL,测定毛蕊花糖苷的峰面积,以毛蕊花糖苷的进样量(μg·μL⁻¹)为横坐标(X)、峰面积为纵坐标(Y),绘制标准曲线,得到毛蕊花糖苷的回归方程为 $Y = 3.574 \times 10^6 X - 40\ 115$, $r = 1.000\ 0$,线性范围为 0.103 2~1.032 μg·μL⁻¹。

取裸花紫珠提取后的浓缩液 0.5 mL,置 25 mL 量瓶中,加入 50% 甲醇稀释至刻度。取适量,过 0.45 μm 微孔滤膜,取续滤液,测定,记录色谱图,计算毛蕊花糖苷(AS)提取率。

2.1.3 药材水提取工艺因素与水平 裸花紫珠茎叶中主要的成分毛蕊花糖苷易溶于水,因此采用水加热回流提取方法,采用蒸馏水回流提取。由于裸花紫珠叶的吸水率较大^[7],故在选择加水量的水平时第 1 次加入量比后两次大。选取考察加水量,浸泡时间,提取时间和提取次数 4 个因素。结合参考文献^[7-9],并进行了预实验,最终选取了每个因素的考察水平,因素水平见表 1。

表 1 裸花紫珠水提取水平因素表

水平	因素			
	A 浸泡时间/h	B 加水量/倍	C 提取时间/h	D 提取次数/次
1	1	8.6.6	0.5	1
2	2	10.8.8	1	2
3	4	12.10.10	2	3

2.1.4 提取工艺正交试验方法 取裸花紫珠地上干燥部分,将茎叶剪成均一大小,分成 9 份,每份约 20 g,依次编号为 1~9 组。按照表 2 中 $L_9(3^4)$ 正交表规定的条件进行回流提取,提取液用 200 目纱布

过滤,浓缩,待浓缩液冷却后,加蒸馏水定容到 100 mL,摇匀。按照 2.1.1 和 2.1.2 所述方法测定浸膏得率和毛蕊花糖苷含量。测定结果见表 2 及表 3。

表 2 提取工艺正交试验设计结果

实验号	质量/g	因素				浸膏得率(%)	AS 得率(%)	综合得分
		A	B	C	D			
1	19.8	1	1	1	1	8.30	0.68	39.60
2	21.1	1	2	2	2	16.80	1.37	79.90
3	20.0	1	3	3	3	19.40	1.76	99.30
4	20.0	2	1	2	3	19.60	1.77	100.00
5	20.0	2	2	3	1	11.00	0.89	52.03
6	20.4	2	3	1	2	17.60	1.42	83.10
7	20.3	3	1	3	2	15.00	1.23	71.60
8	20.4	3	2	1	3	14.60	1.21	70.20
9	19.9	3	3	2	1	15.00	1.23	71.60
K1		218.79	211.20	192.89	163.23			
K2		235.13	202.13	251.50	234.60			
K3		213.41	254.00	222.94	269.50			
R		21.72	51.87	58.60	106.26			

注:综合评分 = (浸膏得率/19.60 × 0.3 + AS 得率/1.77 × 0.7) × 100。

表 3 方差分析表

方差来源	离差平方和	自由度	F	P
A	94.21	2	0.093	>0.05
B	482.60	2	0.546	>0.05
C	545.76	2	0.632	>0.05
D	2 011.81	2	5.376	<0.05

比较各因素的极差可知,因素 D(提取次数)对试验结果影响最大,其次是 C、B 和 A,所以因素对综合评分值指标影响大小排序为 D > C > B > A。由方差分析可知,因素 D 具有显著性差异。根据极差分析各因素的均值,可确定裸花紫珠药材水提取最佳工艺为 $A_2 B_3 C_2 D_3$,即药材浸泡时间 2 h 后,提取 3 次,加水量分别为 12, 10, 10 倍量,每次提取时间为 1 h。

2.1.5 工艺验证实验 称取裸花紫珠药材 3 份,每份 50 g,按上述确定的最佳工艺条件提取,对药材水提取工艺进行验证,测定结果见表 4。结果表明,由上述确定的最佳方案提取毛蕊花糖苷的提取率较高,该方案较为稳定。

表 4 水提取验证实验结果

考察指标	试验号			平均值	RSD
	1	2	3		
浸膏得率	19.85	19.82	20.34	20.00	1.46
AS 得率	1.79	1.75	1.87	1.80	3.39

2.2 药效学评价

采用最佳提取工艺提取获得的流浸膏旋蒸浓缩,分别稀释至浸膏浓度为 1.0、0.5 g·mL⁻¹。吸取一种浓度的流浸膏 1 mL 均匀分布于吸水棉垫 2.4 cm × 1.5 cm × 0.1 cm 后,50 ℃ 减压烘干 1 h,分别制成高低两种含药浓度的止血棉垫,记录各棉垫的质量。进行预实验^[10-11],选取市售的云南白药创可贴为阳性药。结果如表 5 所示,显示云南白药创可贴组的平均出血时间与 0.5 g·mL⁻¹组相当,而平均出血量要低于 1.0 g·mL⁻¹组。

表 5 预实验结果

组别	数量/只	平均出血时间/秒	平均出血量/g
云南白药创可贴组	3	23.98 ± 9.60	0.036 ± 0.021
1.0 g·mL ⁻¹ 组	3	20.72 ± 7.38	0.082 ± 0.068
0.5 g·mL ⁻¹ 组	3	24.15 ± 11.17	0.221 ± 0.292

参考预实验的结果,制得含药浓度分别为 0.5、1.0、2.0 g·mL⁻¹的低中高三种止血棉垫。取成年家兔 15 只,随机分为 5 组,低、中、高剂量组、阴性对照组和阳性对照组。将家兔左耳与右耳对齐,于耳缘末端 2/3、1/2、1/3 处,用一次性采血针对家兔耳缘静脉穿刺 1 cm,形成静脉出血后立即在出血处敷以制好的止血棉垫,并用 100 g 砝码压在棉垫

上, 5 s 观察 1 次出血情况, 直至出血停止。记录出血时间, 并称量止血棉垫的质量, 计算出血量。

结果见表 6 和表 7。

表 6 出血时间结果($\bar{x} \pm s$, $n=9$)

组别	数量/只	给药浓度	平均出血时间/秒
阴性对照组	3	0.9% 氯化钠溶液	32.22 ± 11.48
阳性对照组	3	云南白药创可贴	22.05 ± 9.58
低剂量组	3	0.5 g·mL ⁻¹	24.44 ± 11.92
中剂量组	3	1.0 g·mL ⁻¹	20.83 ± 7.49
高剂量组	3	2.0 g·mL ⁻¹	8.33 ± 3.45**

注: 与空白组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

表 7 出血量结果($\bar{x} \pm s$, $n=9$)

组别	数量/只	给药浓度	平均出血量/g
阴性对照组	3	0.9% 氯化钠溶液	0.721 ± 0.152
阳性对照组	3	云南白药创可贴	0.035 ± 0.021**
低剂量组	3	0.5 g·mL ⁻¹	0.218 ± 0.234**
中剂量组	3	1.0 g·mL ⁻¹	0.076 ± 0.056**
高剂量组	3	2.0 g·mL ⁻¹	0.020 ± 0.009**

注: 与空白组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

与空白组相比, 裸花紫珠低、中、高剂量与云南白药创可贴均可以非常显著地减少出血量($P < 0.01$), 其中高剂量组的出血量要低于阳性对照组; 此外, 高剂量组相较空白组也可以明显地减少出血时间($P < 0.01$), 同时高剂量的出血时间也要低于阳性对照组。综上, 说明裸花紫珠水提取物具有一定的外用止血作用, 具有开发成外用止血贴剂的潜力。

3 讨论

在正交试验分析中, 引进综合评价的理念, 使用多指标综合加权评分法可以避免单一评价的片面性, 使分析结果更加科学、客观, 使得提取工艺趋于合理、可信^[12]。本研究以浸膏得率、毛蕊花糖苷的提取得率为指标, 采用正交试验设计, 对裸花紫珠叶中苯乙醇苷类成分的水提取工艺进行研究, 确定了最佳的提取工艺: 药材加水浸泡 2 h, 提取 3 次, 加水倍量分别为 12、10、10, 每次提取 1 h。本研究确定的提取工艺简单可行, 3 次验证实验结果重复性较好, 可为今后裸花紫珠茎叶的水提取提

供参考, 也为日后裸花紫珠制剂的开发提供基础。

本文进一步针对最佳提取工艺所获得的裸花紫珠浸膏, 进行了外用止血药效学的研究。以出血时间和出血量为评价指标, 先进行了预实验。参考预实验的结果, 考察不同剂量对家兔耳缘静脉出血的影响。预实验和正式实验的动物数量、样本量以及实验方法都相同, 且结果基本在同一水平, 两次实验结果都有较好的重复性。此次研究, 初步证明本浸膏具有一定的外用止血作用, 尤其以 2.0 g·mL⁻¹ 的浓度给药时, 作用效果十分显著, 甚至要优于市售的云南白药创可贴, 表明了本浸膏作为外用止血药物开发的潜力。本次研究, 参考止血贴的制作流程, 并采用了相应的材料, 这也为裸花紫珠外用止血贴的研制提供了基础。

参考文献

- [1] 陈保. HPLC-DAD 测定裸花紫珠中木樨草苷和毛蕊花糖苷[J]. 新中医, 2015, 47(7): 275-276.
- [2] 王艳. 裸花紫珠的临床应用研究进展[J]. 现代中西医结合杂志, 2014, 23(35): 3983-3985.
- [3] 周志强. 裸花紫珠化学成分的研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2013.
- [4] 黄波. 裸花紫珠化学成分及其胶囊质量标准研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2014.
- [5] 张洁, 李宝泉, 冯锋, 等. 裸花紫珠的化学成分及其止血活性研究[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(24): 3297-3301.
- [6] 刘小芬, 李顺祥. 裸花紫珠研究进展[J]. 中南药学, 2015, 13(4): 396-402.
- [7] 王勇, 文苑, 李永辉. 正交试验优选裸花紫珠叶中苯乙醇苷类成分的水提取工艺[J]. 中成药, 2015, 37(8): 1856-1858.
- [8] 刘德贤, 陶遵威. 正交实验法优选调经颗粒的提取工艺[J]. 承德医学院学报, 2015, 32(3): 195-197.
- [9] 赵明德, 肖顺汉, 孙琴, 等. 金钗石斛保健酒增强机体免疫力的筛选研究[J]. 酿酒科技, 2016(4): 77-80.
- [10] 王巍, 程明和, 高静, 等. 白及止血海绵止血作用的实验研究[J]. 药学实践杂志, 2016, 34(1): 32-35, 65.
- [11] 康佐文, 宋国明, 周文丽, 等. 立止血对家兔止血效果的研究[J]. 蛇志, 2000, 12(2): 8-10.
- [12] 张跃, 焦连庆, 于敏, 韩梅. 多指标综合加权评分法优选蜂胶总黄酮提取工艺研究[J]. 中国药师, 2012, 15(6): 759-762.

(收稿日期 2017-08-29)