

中图分类号:R943 文献标志码:A 文章编号:1006-4931(2023)08-0049-07  
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2023.08.012



## Box - Behnken 响应面法优化西红二冬膏制备工艺\*

何英蒙,赵福兰,赖慧,梁刚,殷文贤<sup>△</sup>

(西南医科大学附属中医医院,四川 泸州 646000)

**摘要:**目的 优化西红二冬膏的制备工艺。方法 在单因素试验基础上,以西红花苷 I、II 得率为考察指标,以乙醇体积分数、液料比、提取温度和提取时间为考察因素,采用 Box - Behnken 响应面法优化西红花药材饮片的提取工艺;以干膏得率为考察指标,以液料比、提取时间、提取次数为考察因素,同法优化二冬膏制备工艺。综合确定西红二冬膏制备工艺。结果 西红二冬膏最佳提取工艺为,取处方量西红花药材饮片,按液料比 1 000:1(mL/g)加入 45% 乙醇,90℃提取 2.0 h,挥去乙醇;取处方量天冬、麦冬药材饮片,剪碎,按液料比 18:1(mL/g)加纯化水,加热提取 2.5 h,重复 3 次,再与西红花提取液合并、浓缩得清膏。结论 优化所得西红二冬膏制备工艺稳定、可行。

**关键词:**西红二冬膏;西红花苷;Box - Behnken 响应面法;醇提工艺;制备工艺;工艺优化

### Optimization of Preparation Process of Xihong Erdong Paste by Box - Behnken Design Response Surface Methodology

HE Yingmeng, ZHAO Fulan, LAI Hui, LIANG Gang, YIN Wenxian

(The Affiliated Traditional Chinese Medicine Hospital of Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan, China 646000)

**Abstract: Objective** To optimize the preparation process of Xihong Erdong Paste. **Methods** Based on the single factor test, Box - Behnken response surface methodology was used to optimize the extraction process of Crocus Flos with the yield of crocin I and II as the evaluation index, and with the volume fraction of ethanol, liquid - solid ratio, extraction temperature, and extraction time as the evaluation factors. The preparation process of Erdong Paste was optimized by the same method with the yield of dry extract as the evaluation index, and with the liquid - solid ratio, extraction time, and extraction times as the evaluation factors. The preparation process of Xihong Erdong Paste was comprehensively determined. **Results** The optimal extraction process of Xihong Erdong Paste was as follows: after taking the prescribed dose of Crocus Flos, adding 45% ethanol solution at the liquid - solid ratio of 1 000:1 (mL/g) and extracting at 90℃ for 2.0 h, and evaporating the ethanol; after taking the prescribed dose of Asparagi Radix and Ophiopogonis Radix, mincing and then adding pure water at a liquid - solid ratio of 18:1 (mL/g), heating and extracting for 2.5 h and repeating for three times, and then merging the paste with the Crocus Flos extract and concentrating to obtain a clear paste. **Conclusion** The optimal preparation process of Xihong Erdong Paste is stable and feasible.

**Key words:** Xihong Erdong Paste; crocin; Box - Behnken response surface methodology; alcohol extraction process; preparation process; process optimization

黄褐斑属面部色素沉着性皮肤病,病因病机复杂,易复发<sup>[1-2]</sup>。二冬膏始载于明朝《摄生秘剖》<sup>[3]</sup>,1963年版及之后各版《中国药典》中均有收录,其由天冬、麦冬各 500 g 组方,擅养阴润肺<sup>[4]</sup>,有促进机体能量代谢、提高机体免疫力、抗病毒、抗菌等作用<sup>[5]</sup>。西红花为鸢尾科植物番红花 *Crocus sativus* L. 的干燥柱头,除有活血化瘀功效外,其含有的西红花苷还具有抗氧化、抗炎作用,可使皮肤光泽亮丽<sup>[4-6]</sup>。将西红花加入二冬膏中制成西红二冬膏,既加强了活血祛瘀、养阴润燥功效,又有美白消斑、活血通络作用。但目前有关西红花和二冬膏有效活性成分及提取工艺的报道较少,且我院使用

的西红二冬膏多为临方加工,缺乏稳定、可控的制备工艺,无法大规模推广。故本研究中主要考察和筛选了该制剂的制备工艺,以为其工业化生产及推广使用奠定基础。现报道如下。

#### 1 仪器与试药

##### 1.1 仪器

AUW120D 型分析天平、LC - 2030 Plus 型高效液相色谱仪(日本 Shimadzu 公司);HH - 4 型数显恒温水浴锅(上海上登实验设备有限公司)。

##### 1.2 试药

西红花苷 I、II 对照品(中国食品药品检定研究

\*基金项目:西南医科大学 - 西南医科大学附属中医医院联合项目[2020XYLH - 076]。

第一作者:何英蒙,女,硕士研究生,药师,研究方向为中药制剂工艺及质量控制,(电子信箱)heyngmeng925@163.com。

<sup>△</sup>通信作者:殷文贤,男,硕士研究生,主管中药师,研究方向为中药品质、质量与资源,(电子信箱)yinwenxiantt@qq.com。

院,批号分别为111588-201704,111589-201705,含量分别为88.4%,92.2%);甲醇为色谱纯,乙醇为分析纯,水为纯化水;西红花、天冬、麦冬药材饮片(四川天植中药股份有限公司,批号分别为20200826,20120201,20040101)。

## 2 方法与结果

### 2.1 西红二冬膏制备工艺流程

西红花药材饮片经乙醇提取并挥去乙醇,得醇提液;天冬、麦冬药材饮片经水提得水提液。合并2种提取液,浓缩,即得西红二冬膏。

### 2.2 西红花苷得率

#### 2.2.1 色谱条件

色谱柱:Kromasil C<sub>18</sub>柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇-水(48:52, V/V);流速:0.8 mL/min;检测波长:440 nm;柱温:40 °C;进样量:10 μL<sup>[7-8]</sup>。

#### 2.2.2 溶液制备

取西红花苷 I, II 对照品各适量,精密称定,加稀乙醇溶解,制成每1 mL分别含西红花苷 I 0.283 6 mg及西红花苷 II 0.192 4 mg的混合对照品溶液。取西红花药材饮片样品约50 mg,精密称定,置圆底烧瓶中,加50%乙醇50 mL,称定质量,90 °C回流2.0 h,冷却,补足减失的质量,经0.22 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得供试品溶液<sup>[9]</sup>。以50%乙醇为阴性对照溶液。

#### 2.2.3 方法学考察

专属性试验:取2.2.2项下混合对照品溶液、供试品溶液、阴性对照溶液各适量,按2.2.1项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果阴性对照无干扰,表明专属性良好。详见图1。

线性关系考察:精密量取2.2.2项下混合对照品溶液适量,加乙醇稀释成西红花苷 I 质量浓度分别为14.18, 28.36, 35.45, 70.90, 141.80 μg/mL, 西红花苷 II 质量浓度分别为9.62, 19.24, 24.05, 48.10, 96.20 μg/mL的系列混合对照品溶液,按2.2.1项下色谱条件进样测定,分别以西红花苷 I, II 的质量浓度

(X, μg/mL)为横坐标,以峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程 $Y_1 = 67\ 684 X_1 - 277\ 084$ ( $r = 0.999\ 9$ ), $Y_2 = 91\ 109 X_2 - 261\ 148$ ( $r = 0.999\ 9$ )。结果表明,西红花苷 I, II 质量浓度分别在14.18~141.80 μg/mL和9.62~96.20 μg/mL范围内与峰面积线性关系良好。

精密度、稳定性、重复性:按相关要求方法进行方法学考察,结果精密度、稳定性、重复性试验的RSD均小于2.0%,表明仪器精密度良好,供试品溶液在室温放置12 h内基本稳定,方法重复性良好。

#### 2.2.4 西红花苷得率测定与计算

取西红花药材饮片样品适量,按2.2.2项下方法制备供试品溶液,按2.2.1项下色谱条件进样测定,计算西红花苷得率。西红花苷得率(%) =  $(C_1 + C_2) \times V / m_{原} \times 100\%$ (其中, $C_1$ 和 $C_2$ 分别为西红花苷 I, II 的质量浓度, $V$ 为提取液体积, $m_{原}$ 为西红花药材饮片样品质量)。

### 2.3 二冬膏干膏得率

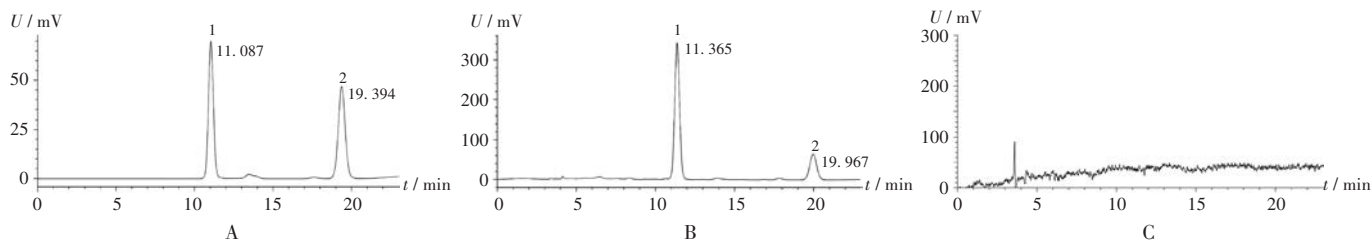
取天冬、麦冬水提液浓缩至适量,置干燥至恒重的蒸发皿中,蒸干后转移至烘箱,80 °C干燥至恒重。计算二冬膏干膏得率。干膏得率(%) =  $(m_2 - m_1) / m_{总} \times 100\%$ (其中, $m_2$ 为烘干后蒸发皿和干膏的总质量, $m_1$ 为蒸发皿质量, $m_{总}$ 为天冬和麦冬原料的总质量)<sup>[10-12]</sup>。

### 2.4 西红花药材饮片提取工艺优化

#### 2.4.1 单因素试验

乙醇体积分数:取西红花药材饮片样品约50 mg,共5份,设定液料比为1 000 mL/g,回流温度90 °C,回流时间1.0 h,分别用10%, 30%, 50%, 70%, 90%乙醇提取。结果见图2 A。可见,西红花苷得率随乙醇体积分数的增加,先增大,后稍减小,并在乙醇体积分数为50%时最大。故乙醇体积分数选择50%。

液料比:取西红花药材饮片样品约50 mg,共4份,设定乙醇体积分数为50%,回流温度90 °C,回流时间1 h,考察当液料比分别为600, 800, 1 000, 1 200 mL/g时西红花苷得率的变化,结果见图2 B。可见,西红花苷得率随液料比的增加,先升高后下降,液料比为1 000 mL/g



1. 西红花苷 I 2. 西红花苷 II  
A. 混合对照品溶液 B. 供试品溶液 C. 阴性对照溶液

图1 高效液相色谱图

1. Crocin I 2. Crocin II

A. Mixed reference solution B. Test solution C. Negative reference solution

Fig. 1 HPLC chromatograms

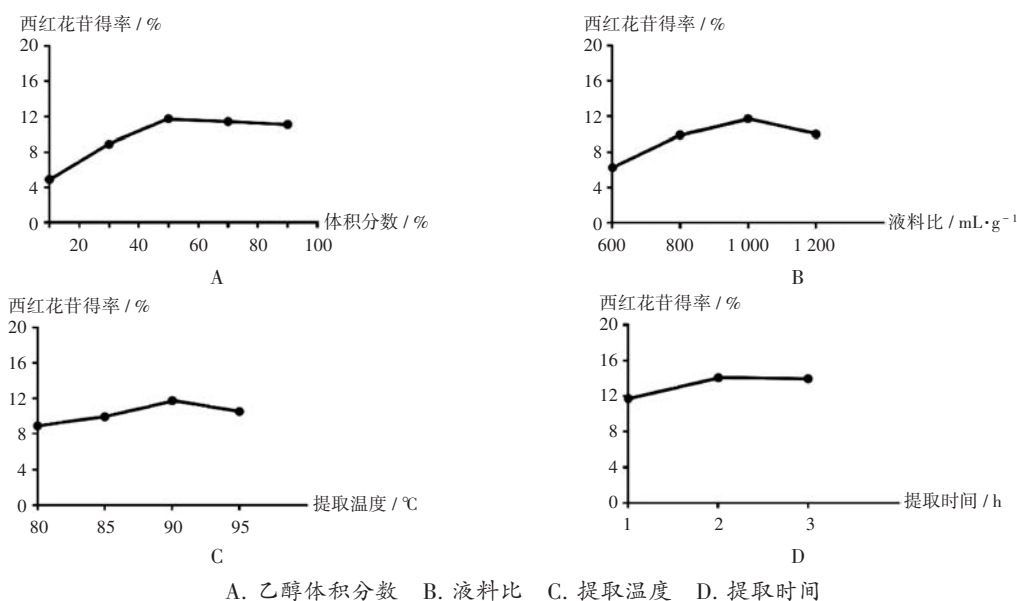


图2 西红花苷得率单因素试验结果

A. Ethanol volume fraction B. Liquid - solid ratio C. Extraction temperature D. Extraction time

Fig.2 Results of the single factor test of the dry extract of crocin

时达最大后逐渐减少。故液料比选择1000 mL/g。

提取温度:取西红花药材饮片样品约50 mg,共4份,设定乙醇体积分数为50%,液料比为1000 mL/g,提取时间为1.0 h,分别对不同提取温度(80,85,90,95 °C)进行考察,结果见图2 C。可见,随着提取温度的升高,西红花苷得率先逐渐增大,90 °C时达最大,后略下降。故提取温度选择90 °C。

提取时间:取西红花药材饮片样品约50 mg,共3份,设定乙醇体积分数为50%,液料比为1000 mL/g,提取温度为90 °C,对提取时间(1.0,2.0,3.0 h)进行考察,结果见图2 D。可见,西红花苷得率随着提取时间的增加先增加,在2.0 h时最大,后基本不变。故提取时间选择2.0 h。

#### 2.4.2 工艺优化<sup>[13-15]</sup>

试验设计与结果:在单因素试验基础上,以乙醇体积分数(因素A)、液料比(因素B)、提取温度(因素C)、提取时间(因素D)为考察因素,以西红花苷得率为考察指标,进行Box - Behnken响应面法试验。因素与水平见表1,试验设计与结果见表2。

模型拟合与方差分析:对上述试验结果进行多元

表1 西红花提取工艺影响因素与水平

Tab.1 Influence factors and levels of the extraction process of Crocus Flos

水平	因素A(%)	因素B(mL/g)	因素C(°C)	因素D(h)
-1	45	800	85	1.5
0	50	1000	90	2.0
1	55	1200	95	2.5

表2 西红花提取工艺Box - Behnken试验设计与结果

Tab.2 Box - Behnken design and results of the extraction process of Crocus Flos

试验号	因素				西红花苷得率(%)	试验号	因素				西红花苷得率(%)
	A	B	C	D			A	B	C	D	
1	0	-1	-1	0	10.75	16	1	1	0	0	9.85
2	-1	-1	0	0	10.69	17	1	-1	0	0	11.49
3	-1	0	-1	0	11.84	18	0	0	0	0	12.95
4	0	0	-1	1	11.97	19	0	0	0	0	13.98
5	0	1	1	0	9.34	20	0	0	1	1	10.54
6	0	0	1	-1	10.12	21	-1	0	1	0	12.79
7	0	0	0	0	13.58	22	0	0	-1	-1	11.18
8	0	0	0	0	13.40	23	-1	1	0	0	11.70
9	-1	0	0	1	12.20	24	1	0	1	0	7.48
10	1	0	-1	0	11.72	25	1	0	0	-1	11.35
11	0	-1	0	-1	9.28	26	0	1	0	-1	10.30
12	0	-1	1	0	7.63	27	0	1	0	1	10.58
13	-1	0	0	-1	13.17	28	1	0	0	1	13.16
14	0	0	0	0	14.13	29	0	1	-1	0	10.71
15	0	-1	0	1	11.07						

二次回归拟合,以各因素为自变量,以西红花苷得率( $Y_3, \%$ )为因变量,得回归方程  $Y_3 = -920.48077 + 6.64180A + 0.11447B + 15.85943C + 6.89193D - 0.00066AB - 0.05194AC + 0.27826AD + 0.44 \times 10^{-3}BC - 3.76 \times 10^{-3}BD - 0.03749CD - 0.01982A^2 - 0.6 \times 10^{-4}B^2 - 0.07665C^2 - 3.24544D^2 (r = 0.9602)$ ,表明该回归模型的拟合情况良好,回归方程的代表性较好,能准确预测实际情况。该模型的方差分析结果

见表3。推测影响西红花苷得率的因素大小顺序为  $C > A > D > B$ ; 经检验所建模型具有显著差异 ( $P < 0.0001$ ), 失拟项检验无显著性 ( $P > 0.05$ ), 说明模型与实际情况吻合良好, 模型拟合结果受未知因素干扰较少, 误差较小, 该模型可较好地描述各因素与响应值间的真实关系。

表3 西红花提取工艺拟合回归分析结果

Tab. 3 Results of the regression analysis of the extraction process of Crocus Flos

方差来源	离差平方和	自由度	均方差	F值	P值
模型	74.95	14	5.35	11.81	<0.0001
A	4.51	1	4.51	9.95	0.007
B	0.21	1	0.21	0.46	0.5109
C	8.80	1	8.80	19.41	0.0006
D	1.42	1	1.42	3.13	0.0985
AB	1.76	1	1.76	3.89	0.0686
AC	6.74	1	6.74	14.88	0.0017
AD	1.94	1	1.94	4.27	0.0578
BC	0.77	1	0.77	1.70	0.2137
BD	0.57	1	0.57	1.25	0.2827
CD	0.035	1	0.035	0.078	0.7848
A <sup>2</sup>	1.59	1	1.59	3.52	0.0818
B <sup>2</sup>	32.87	1	32.87	72.51	<0.0001
C <sup>2</sup>	23.82	1	23.82	52.55	<0.0001
D <sup>2</sup>	4.27	1	4.27	9.42	0.0083
残差	6.35	14	0.45		
失拟项	5.46	10	0.55	2.45	0.201
纯误差	0.89	4	0.22		
总和	81.3	28			

响应面图与等高线分析: 分别以乙醇体积分数(A)、液料比(B)、提取温度(C)和提取时间(D)为响应因子, 以西红花苷得率为响应值, 绘制等高线图 and 响应面图, 详见图3。可见, 各交互作用均较明显。基于以上结果, 初步得西红花苷最佳提取工艺, 乙醇体积分数45%、液料比1 042.77 mL/g, 提取温度90.736℃, 提取时间1.863 h。在此条件下, 西红花苷得率的预测值为13.892%。考虑到试验的便捷性与可操作性, 对预测的工艺参数进行微调, 最终确定最佳工艺参数为, 乙醇体积分数45%, 液料比1 000 mL/g, 提取温度90℃, 提取时间2.0 h。

#### 2.4.3 验证试验

取西红花药材饮片样品50 mg, 共3份, 按上述最佳工艺参数进行验证试验。结果西红花苷得率分别为13.04%, 13.33%, 13.08%, 平均13.15%, RSD为0.72% ( $n = 3$ ), 实测值与预测值的RSD为4.08%。表明方程与

真实试验拟合较好, 优化确定的工艺稳定、可行。

## 2.5 二冬膏提取工艺优化

### 2.5.1 单因素试验

浸泡时间: 取天冬、麦冬药材饮片样品各5 g, 共4份, 分别浸泡0, 6, 12, 24 h, 设定液料比为10 mL/g, 提取时间为1.0 h, 提取1次, 分别对不同浸泡时间进行考察, 结果见图4 A。可见, 浸泡时间对二冬膏干膏得率几无影响, 故选择直接提取。

液料比: 取天冬、麦冬药材饮片样品各5 g, 共4份, 设定提取时间为1.0 h, 提取1次, 分别在液料比为10, 15, 20, 25 mL/g时进行考察。结果见图4 B。可见, 随着液料比增加, 二冬膏干膏得率先增大后基本不变, 当液料比为15:1时, 二冬膏的干膏得率最高。

提取时间: 取天冬、麦冬药材饮片样品各5 g, 共3份, 设定液料比为15 mL/g, 提取次数为1次, 提取时间分别为1.0, 2.0, 3.0 h进行考察, 结果见图4 C。可见, 干膏得率随提取时间的增加呈上升趋势, 达到2.0 h时, 干膏得率基本不再增加。

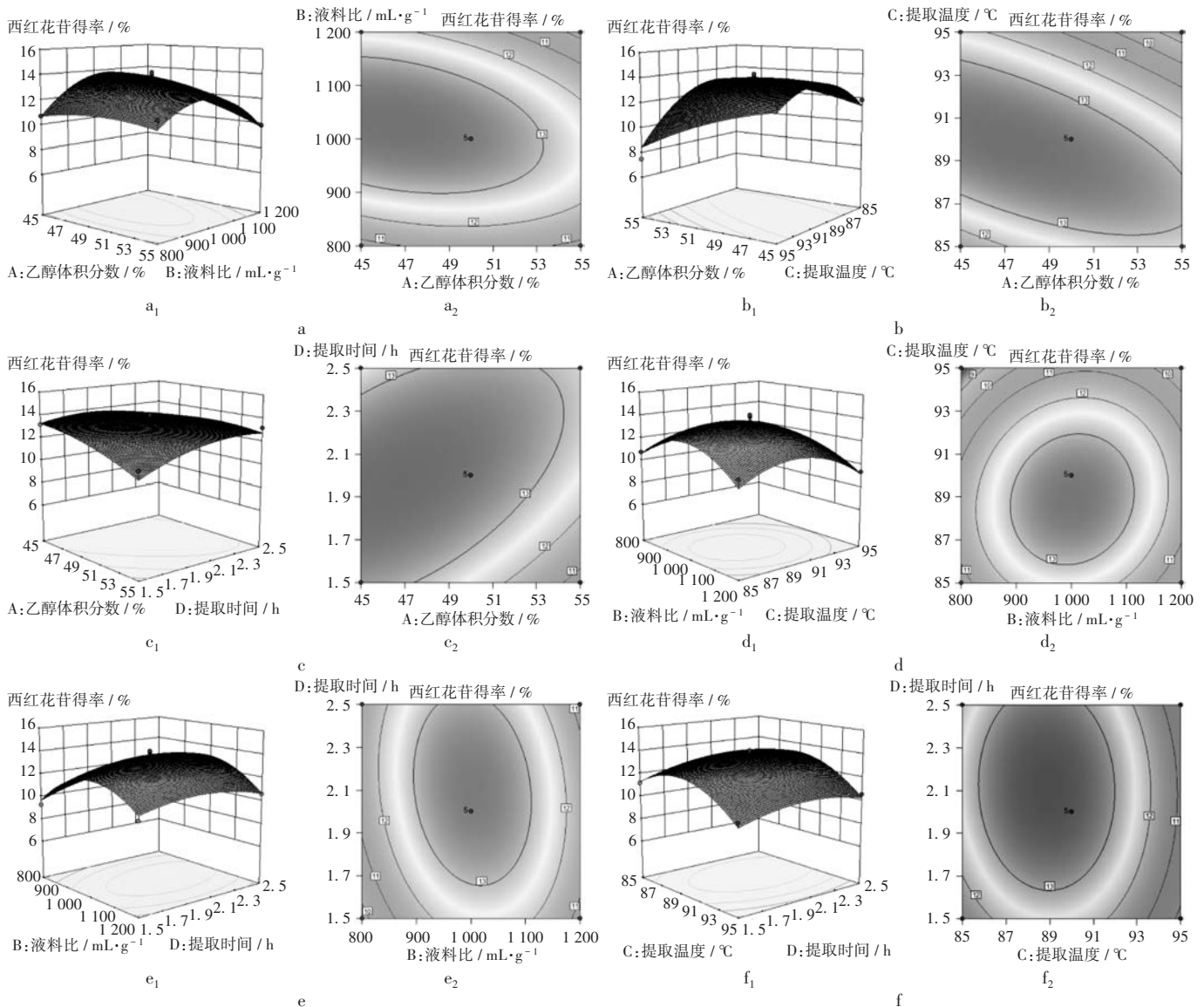
提取次数: 取天冬、麦冬药材饮片样品各5 g, 共3份, 固定液料比为15 mL/g, 提取时间为2.0 h, 分别提取1, 2, 3次进行考察, 结果见图4 D。可见, 随着提取次数的增加, 干膏得率先增加后基本不变。故以提取2次进行下一步研究。

### 2.5.2 工艺优化<sup>[10,13-15]</sup>

试验设计与结果: 在单因素试验基础上, 采用Box-Behnken响应面法, 以液料比(因素A)、提取时间(因素B)、提取次数(因素C)为考察因素, 以二冬膏干膏得率为响应值, 设计三因素三水平的响应面试验, 因素与水平见表4, 试验设计及结果见表5。

模型拟合与方差分析: 对试验数据进行拟合, 以建立二次多元回归方程。干膏得率( $Y_4, \%$ ) =  $-39.025 + 6.10A - 2.545B + 43.424C + 0.555AB + 0.754AC + 0.980BC - 0.256A^2 - 0.987B^2 - 12.172C^2$ 。该模型的方差分析结果见表6。根据F值的大小, 得出各因素对二冬膏干膏得率的影响大小顺序为  $C > A > B$ , 模型具有显著差异 ( $P < 0.0001$ ), 说明该模型拟合程度良好; 失拟项 ( $P > 0.05$ ) 说明检验无显著差异, 未知因素对模型拟合结果干扰少, 误差较小。二冬膏干膏得率与各试验因素间的线性关系显著 ( $R^2 = 0.9822, R^2_{Adj} = 0.9593$ ), 提示该模型可用于分析和预测二冬膏干膏得率。

响应面分析与优化: 根据回归方程分析结果, 绘制响应面图和等高线图, 结果见图5。可见, 各交互因素的响应面形状均较陡, 等高线均呈明显的椭圆形, 说明各



$a_1, b_1, c_1, d_1, e_1, f_1$ . 响应面图  $a_2, b_2, c_2, d_2, e_2, f_2$ . 等高线图

a. 乙醇体积分数与液料比 b. 乙醇体积分数与提取温度 c. 乙醇体积分数与提取时间 d. 液料比与提取温度 e. 液料比与提取时间 f. 提取温度与提取时间

图3 西红花苷得率的响应面图和等高线图

$a_1, b_1, c_1, d_1, e_1, f_1$ . Response surface plot  $a_2, b_2, c_2, d_2, e_2, f_2$ . Contour plot

a. Ethanol volume fraction and liquid - solid ratio b. Ethanol volume fraction and extraction temperature c. Ethanol volume fraction and extraction time d. Liquid - solid ratio and extraction temperature e. Liquid - solid ratio and extraction time f. Extraction temperature and extraction time

Fig. 3 Response surface plot and contour plot of the dry extract of crocin

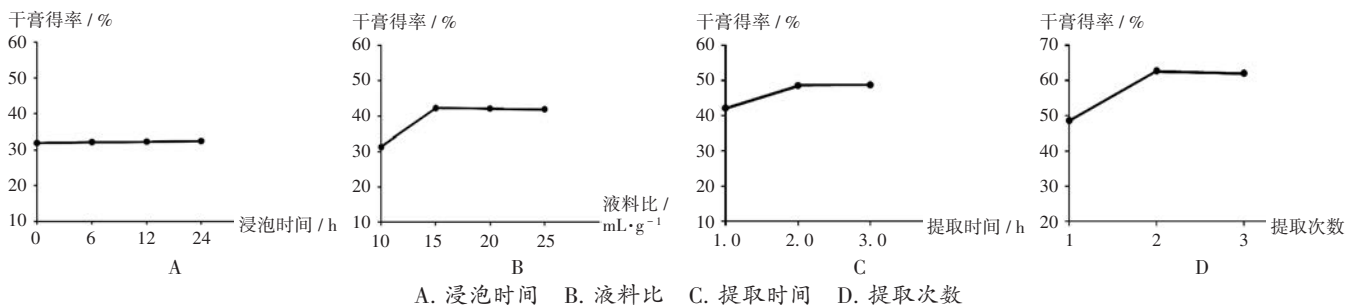


图4 二冬膏干膏得率单因素试验结果

A. Soaking time B. Liquid - solid ratio C. Extraction time D. Extraction time

Fig. 4 Results of the single factor test of the dry extract yield of Erdong Paste

表4 二冬膏制备工艺影响因素与水平

Tab. 4 Influence factors and levels of the preparation process of Erdong Paste

水平	因素A(mL/g)	因素B(h)	因素C(次)
-1	10	1	1
0	15	2	2
1	20	3	3

表5 二冬膏制备工艺 Box - Behnken 试验设计及结果

Tab. 5 Box - Behnken design and results of the preparation process of Erdong Paste

试验号	因素			干膏得率 (%)	试验号	因素			干膏得率 (%)
	A	B	C			A	B	C	
1	1	1	0	69.86	10	1	0	-1	43.61
2	1	-1	0	57.70	11	0	-1	-1	42.16
3	0	1	-1	48.74	12	-1	-1	0	55.19
4	-1	0	1	45.98	13	0	0	0	63.46
5	0	0	0	67.79	14	0	-1	1	57.26
6	0	0	0	68.55	15	0	0	0	68.56
7	1	0	1	66.14	16	-1	0	-1	38.53
8	-1	1	0	56.25	17	0	1	1	67.76
9	0	0	0	67.32					

表6 二冬膏制备工艺拟合回归分析结果

Tab. 6 Results of the fitting and regression analysis of the preparation process of Erdong Paste

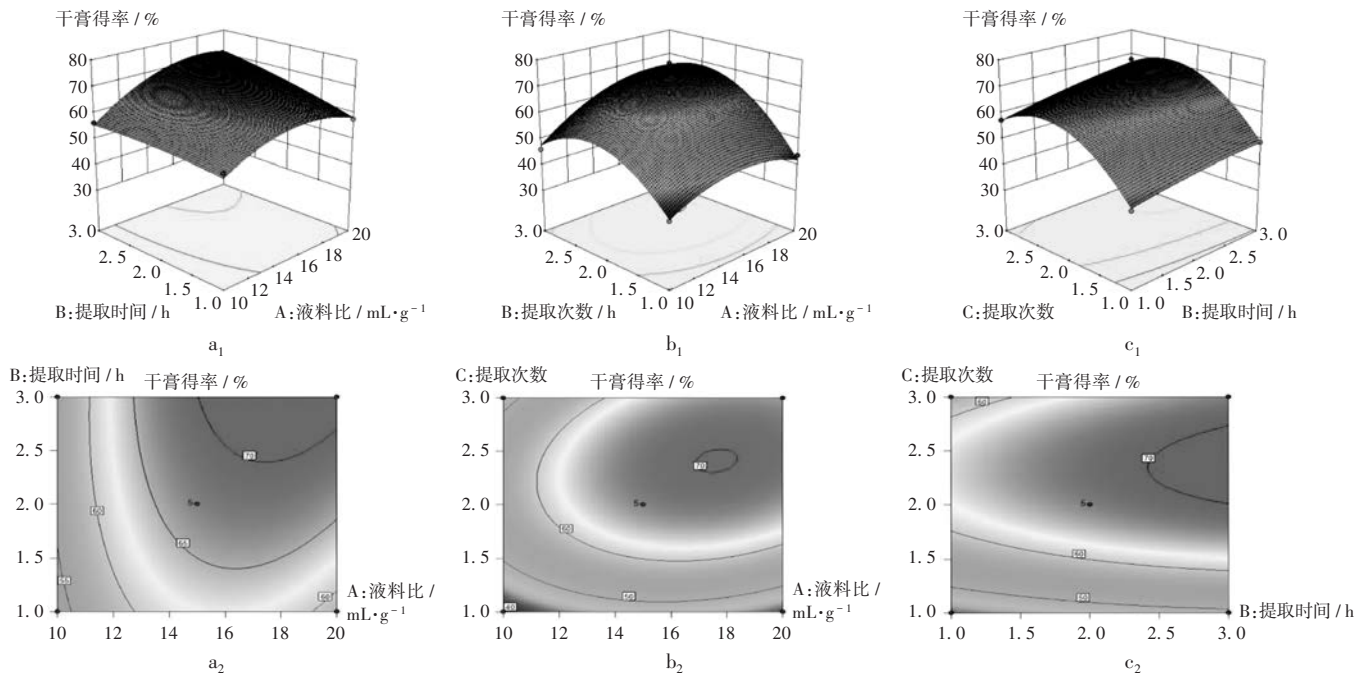
方差来源	离差平方和	自由度	均方差	F值	P值
模型	1 784.17	9	198.24	42.88	<0.000 1
A	213.81	1	213.81	46.25	0.000 3
B	114.74	1	114.74	24.82	0.001 6
C	513.60	1	513.60	111.09	<0.000 1
AB	30.78	1	30.78	6.66	0.036 5
AC	56.92	1	56.92	12.31	0.009 9
BC	3.84	1	3.84	0.83	0.392 4
A <sup>2</sup>	172.53	1	172.53	37.32	0.000 5
B <sup>2</sup>	4.10	1	4.10	0.89	0.377 4
C <sup>2</sup>	623.83	1	623.83	134.94	<0.000 1
残差	32.36	7	4.62		
失拟项	14.39	3	4.80	1.07	0.456 2
纯误差	17.97	4	4.49		
总和	1 816.53	16			

性与可操作性,对预测的工艺参数进行微调,最佳确定工艺参数为液料比 18 mL/g,提取时间 2.5 h,提取3次。

### 2.5.3 验证试验

取天冬、麦冬药材饮片样品各 5 g,共 3 份,按上述确定最佳工艺进行验证试验。结果 3 次验证试验的干膏

交互作用均较明显。初步得二冬膏最优提取工艺为,液料比 18.454 mL/g,提取时间 2.386 h,提取 2.474 次,预测干膏得率为 72.184%。考虑到试验的便捷性、可行



a<sub>1</sub>, b<sub>1</sub>, c<sub>1</sub>. 响应面图 a<sub>2</sub>, b<sub>2</sub>, c<sub>2</sub>. 等高线图

a. 提取时间与液料比 b. 提取次数与液料比 c. 提取次数与提取时间

图5 二冬膏干膏得率的响应面图和等高线图

a<sub>1</sub>, b<sub>1</sub>, c<sub>1</sub>. Response surface plot a<sub>2</sub>, b<sub>2</sub>, c<sub>2</sub>. Contour plot

a. Extraction time and liquid - solid ratio b. Extraction times and liquid - solid ratio c. Extraction times and extraction time

Fig. 5 Response surface plot and contour plot of the dry extract yield of Erdong Paste

得率分别为69.50%, 71.43%, 69.87%, 平均干膏得率为70.27%, RSD为1.46% ( $n=3$ ), 实测值与预测值的RSD为1.90%。表明方程与真实试验情况拟合较好, 优化的工艺稳定、可行。

## 2.6 西红二冬膏制备工艺确定

根据试验结果, 最终优化确定西红二冬膏的制备工艺为, 取处方量的西红花药材饮片样品, 按液料比1 000 mL/g加入45%乙醇溶液, 90℃提取2.0 h, 挥去乙醇备用; 取处方量的天冬、麦冬饮片, 剪碎, 按液料比18 mL/g加入纯化水, 加热提取2.5 h, 过滤, 收集滤液, 残渣按上述步骤再提取2次, 合并滤液, 再与西红花提取液合并, 浓缩至相对密度为1.21~1.25(80℃)的清膏。

## 3 讨论

本课题组前期对西红二冬膏的组方药味进行分析, 因西红花属贵重药材, 采用单独提取后与二冬膏合并的制备方式。原方采用将西红花用热水浸泡后与二冬膏提取液合并的方式制备西红二冬膏, 可能导致西红花有效成分不能被充分提取。因此本研究中参考2020年版《中国药典(一部)》西红花含量测定项下方法, 采用醇提法对西红花进行提取, 并考察了乙醇体积分数对西红花提取率的影响, 结果显示, 乙醇体积分数为45%时, 西红花苷(I, II)的得率最高。

西红花苷I, II均有抗氧化与抗自由基作用<sup>[16-18]</sup>, 与西红二冬膏方的临床适应证相关。据报道, 对两成分的提取多采用超声提取法<sup>[9, 19-20]</sup>。故试验过程中分别考察了超声提取和回流提取对提取效果的影响(预试验结果显示, 提取次数对西红花苷得率无显著影响), 结果显示, 回流提取的西红花苷(I, II)得率明显高于超声提取, 且有研究证明在一定范围内, 提取温度升高有导致西红花苷(I, II)得率增加的趋势<sup>[20]</sup>。故本研究中采用回流提取法。

为同时测定药材饮片中西红花苷I, II的含量, 本研究中首先参照2020年版《中国药典(一部)》的色谱条件, 以甲醇-水(45:55, V/V)为流动相, 但此条件下西红花苷I, II的出峰时间间隔不大, 且峰形不理想。在综合有关研究<sup>[7-8]</sup>的基础上, 经多次调整流动相比例, 发现以甲醇-水(48:52, V/V)为流动相进行洗脱, 所得色谱峰峰形良好, 分离度高。

综上所述, 本研究中采用回流提取方式对西红花药材饮片进行提取, 在单因素试验基础上采用Box-Behnken响应面法分别对西红花和二冬膏的提取工艺进行了优化, 最终确定了西红二冬膏的最佳制备工艺, 为后续工业大生产及推广使用提供了参考。

## 参考文献

[1] 王希, 王万春. 黄褐斑的治疗进展[J]. 中国民间疗法, 2019, 27(20): 103-105.

- [2] 孙亚如, 李芳梅, 祁希希, 等. 中医治疗黄褐斑的研究进展[J]. 光明中医, 2022, 37(14): 2646-2649.
- [3] 牛亚华. 摄生秘剖/栖芬室藏中医典籍精选[M]. 北京: 北京科学技术出版社, 2017: 15.
- [4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 455.
- [5] 赵益, 张启云, 李冰涛, 等. 二冬汤对大鼠尿液代谢产物的影响[J]. 中药新药与临床药理, 2013, 24(2): 173-176.
- [6] 刘涛, 楚溪, 韩雪, 等. 西红花苷的药理学研究进展[J]. 广东化工, 2016, 43(17): 77-78.
- [7] 袁娟丽, 刘明智, 张钰祺. HPLC法测定红玲清散中西红花苷I和红花苷II的含量[J]. 江西中医药, 2018, 49(3): 71-73.
- [8] 高丽, 王旭, 张景景, 等. HPLC法测定不同产地西红花中西红花苷-I和红花苷-II的含量[J]. 中华中医药学刊, 2017, 35(9): 68-70.
- [9] 庞克坚, 翟欣, 唐辉, 等. UPLC法测定维药罗补甫克比日丸的西红花药材和制剂中西红花苷的含量[J]. 中国民族医药杂志, 2018, 24(3): 42-45.
- [10] 徐晓秋, 傅超美, 季宁平, 等. 星点设计-效应面法优化黄连煮散颗粒煎煮工艺及其与传统饮片化学计量对比研究[J]. 中药与临床, 2012, 3(6): 20-22.
- [11] 陈艳熙, 陈安利, 马卓. 正交试验优选补血养元合剂提取工艺[J]. 湖北工业大学学报, 2022, 37(4): 62-65.
- [12] 邱华, 范春娇, 苏翠丽, 等. 白花香莲解毒颗粒制备工艺研究[J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(23): 2921-2925.
- [13] 黄周峰, 胡筱希, 黄建猷, 等. Box-Behnken设计-响应面法优化小槐花中柠檬酚的超声辅助乙醇-硫酸铵双水相提取工艺[J]. 中国药房, 2020, 31(9): 1085-1090.
- [14] 孔征, 毛乐静, 霍仕霞, 等. Box-Behnken响应面法优化管花肉苁蓉中毛蕊花糖苷的提取工艺研究[J]. 中国药房, 2019, 30(14): 1970-1974.
- [15] 张文秀, 朱卫丰, 聂鹤云, 等. Box-Behnken响应面法优化马钱子提取工艺[J]. 中成药, 2015, 37(9): 1932-1936.
- [16] 苏文钊, 陈阳, 蔡仕宁, 等. 栀子中西红花苷和 gardecin 的抗氧化活性研究[J]. 华西药学杂志, 2016, 31(1): 3-5.
- [17] 孙剑斌, 刘艳霞, 刘国清, 等. 西红花苷的药理研究进展[J]. 西南国防医药, 2011, 21(8): 914-916.
- [18] MEHRABANI M, GOUDARZI M, MEHRZADI S, et al. Crocin: a protective natural antioxidant against pulmonary fibrosis induced by bleomycin [J]. Pharmacol Rep, 2020, 72(4): 992-1001.
- [19] 许林, 皮家菊, 满海燕, 等. 栀子不同部位栀子苷和西红花苷I的提取工艺和含量测定[J]. 中国农学通报, 2019, 35(4): 136-142.
- [20] 何常明, 谢晓梅, 何美莲, 等. 西红花中西红花苷-1和红花苷-2含量测定方法的建立[J]. 药物分析杂志, 2006, 26(9): 1270-1273.

(收稿日期: 2022-10-04)