

基于体外心肌细胞活力的葛根提取工艺优选

蔡琳, 孟宪生*, 包永睿, 王帅

(辽宁中医药大学药学院, 辽宁 大连 116600)

[摘要] 目的: 优选葛根药材的提取工艺。方法: 采用正交试验法, 选取提取时间、料液比、提取次数及乙醇体积分数为影响因素, 以葛根素含量和药效学的体外心肌细胞活力为指标综合分析, 优选提取工艺条件。结果: 葛根的乙醇提取最佳工艺条件为加 6 倍量 70% 乙醇回流提取 2 次, 每次 1.5 h。结论: 化学指标结合药效学指标综合分析葛根的提取纯化工艺可较好地保证制剂的质量, 且该优选工艺稳定可行。

[关键词] 葛根; 葛根素; 正交试验; 含药血浆; 药效学

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)18-0017-03

Optimization of Extraction Process for *Pueraria lobata* Based on Viability of *in vitro* Myocardial Cell

CAI Lin, MENG Xian-sheng*, BAO Yong-rui, WANG Shuai

(College of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize extraction technology of *Pueraria lobata*. **Method:** With the content of puerarin and pharmacodynamics of *in vitro* myocardial cell viability as comprehensive analysis indexes, orthogonal test was used to optimize extraction technology with extraction time, solid-liquid ratio, extraction times and the concentration of ethanol as factors. **Result:** The best extract condition of *P. lobata* was: refluxing extracted 2 times with 6 times the amount of 70% ethanol, 1.5 h per time. **Conclusion:** Combining with chemical and pharmacodynamic indexes to optimize extraction and purification process could better guarantee quality of preparations, and this optimized technology was stable and feasible.

[Key words] *Pueraria lobata*; puerarin; orthogonal test; drug-containing plasma; pharmacodynamic

总黄酮类成分是葛根中有效成分之一, 其中葛根素是含量最多的黄酮类化合物^[1], 具有扩张冠状动脉、改善心脑血管循环、保护缺血组织和抗组织缺血再灌注损伤、减少急性缺血梗死面积等作用^[2]。本试验通过给培养的心肌细胞换用缺氧培养基和复氧培养基, 建立体外培养心肌细胞 H/RI 模型, 在细胞水平模拟心肌 I/RI, 采用 MTT 法测定细胞存活

率, 结合葛根素含量进行双指标提取工艺优选, 可较好地保证制剂质量。

1 材料

葛根药材购自安国药材批发市场, 经辽宁中医药大学翟延君教授鉴定为豆科植物野葛 *Pueraria lobata* (Wild.) Ohwi 的根。新生 SD 乳鼠 (1~3 d), 昆明小鼠, 由辽宁中医药大学动物室中心提供, 达到国家清洁级标准, 动物合格证号 SCXX (辽) 2008-0002。

1100-DAD 型高效液相色谱仪 (美国 Agilent), 微量移液器 (法国吉尔森科技有限公司), MiLLi-Q 超纯水处理装置 (美国 MiLLipore 公司), NUAIRETM US AUTOFLOW 型 CO₂ 培养箱 (德国 NUAIRE 公司), AE31 型倒置相差显微镜 (Motic 公司), UNRISE 型酶标仪 (瑞士 TECAN 公司), 四甲基

[收稿日期] 20120416(015)

[基金项目] 十一五重大新药创制科技重大专项 (2010ZX09401-304-515)

[第一作者] 蔡琳, 硕士研究生, 从事药物分析研究, Tel: 0411-87406496, E-mail: lin88325@126.com

[通讯作者] * 孟宪生, 博士后, 教授, 从事中药组分配伍及药品质量研究, Tel: 0411-87406496, E-mail: mxsvvv@126.com

偶氮唑盐(MTT,美国 GIBCO 公司),其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 葛根素含量测定

2.1.1 色谱条件与系统适用性试验 Agilent TC-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相 0.1% 磷酸水-甲醇,流速 1 mL·min⁻¹,柱温 25 °C,检测波长 250 nm,进样量 10 μL。

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取葛根素对照品适量,加甲醇制成 0.218 g·L⁻¹的对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液的制备 精密称取一定量葛根药材,加适量乙醇提取一定时间,得葛根提取液,过 0.45 μm 微孔滤膜,即得。

2.2 细胞药效学试验

2.2.1 原代乳鼠心肌细胞的培养^[3-4] 取新生 SD 乳鼠若干只,无菌条件下开胸取心,洗净后将心室剪成碎块放入培养皿里,加入适量冷 PBS 缓冲液,用消化液置 37 °C 水浴中多次消化,收集细胞悬液,以差速贴壁法分离纯化心肌细胞,于 37 °C,5% CO₂ 培养箱里培养 60 min,调整细胞浓度至 1 ~ 5 × 10⁴ 个/mL,转接于 96 孔板里在 37 °C,5% CO₂ 条件下培养。选生长状态佳者于 72 h 后进行试验。

2.2.2 缺氧复氧损伤模型的制备 取接种完成的 96 孔板,每孔加入等量损伤剂,于温度 37 °C,5% CO₂ 饱和湿度条件下常规培养 1 h,换成正常培养液,继续在温度 37 °C,5% CO₂ 饱和湿度条件下常规培养。

2.2.3 含药血浆对缺氧复氧损伤的心肌细胞的保护作用 试验随机分为 10 组,1 组为空白对照组,9 组为正交试验组。ig 3 d,剂量 0.5 mL/次,每天 1 次,眼球取血,置肝素化离心管中,缓慢摇晃,离心 15 min(转速 3 000 r·min⁻¹),吸取上清液即为含药血浆,分装。取已缺氧复氧的原代乳鼠心肌细胞,分别对应加入含 15% 的血浆,置 37 °C,5% CO₂ 培养箱培养 24 h。

2.2.4 细胞活力的测定^[4-5] 细胞计数后以 10⁴ 个/孔接种于 96 孔板,培养 24 h,每孔避光加入 20 μL(5 g·L⁻¹) MTT 试剂,于 37 °C 培养箱继续孵育 4 h,弃上清,加入 150 μL 二甲基亚砜(DMSO),室温摇床 30 min,待紫色结晶充分溶解,于酶标仪 492 nm 波长测定吸收度(A)值,计算药物对细胞的存活率。

$$\text{细胞存活率} = A_{\text{试验组}} / A_{\text{对照组}} \times 100\%$$

2.2.5 统计学处理 试验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用

SPSS 16.0 统计软件进行处理,组间比较用单因素方差和 LSD 检验分析。

2.3 正交试验设计 选择溶媒量、提取时间、提取次数、乙醇体积分数为考察因素^[6],各因素取 3 个水平,用加权综合评分,以细胞存活率为主指标,葛根素含量为次指标进行综合评价,以确定葛根最佳提取条件。药效学评分(X) = (细胞药效学/最大细胞药效学) × 0.7,葛根素含量评分(Z) = (葛根素含量/最大葛根素含量) × 0.3,综合评分(Q) = $X + Z$ 。称取葛根药材 9 份,每份 20 g。按 L₉(3⁴) 正交表安排试验,试验因素水平及安排见表 1,方差分析见表 2。

表 1 葛根提取工艺优选正交试验因素水平及安排

No.	A 料液比	B 时间/h	C 提取次数/次	D 乙醇体积分数/%	葛根素含量/%	存活率/%	综合评分
1	1:6	0.5	1	50	1.04	18.7	0.242
2	1:6	1	2	60	4	55	0.763
3	1:6	1.5	3	70	4.98	70.6	0.971
4	1:8	0.5	2	70	5.51	68.8	0.982
5	1:8	1	3	50	3.21	39	0.562
6	1:8	1.5	1	60	1.89	14.1	0.243
7	1:10	0.5	3	60	3.69	26.6	0.465
8	1:10	1	1	70	2.65	22	0.362
9	1:10	1.5	2	50	3.89	59.1	0.798
K ₁	1.977	1.689	0.846	1.602			
K ₂	1.785	1.686	2.544	1.47			
K ₃	1.626	2.013	1.998	2.316			
R	0.351	0.327	1.698	0.846			

表 2 综合评分方差分析

方差来源	SS	f	F	P
A	0.021	2	0.913	
B(误差)	0.023	2	1.000	
C	0.500	2	21.739	<0.05
D	0.138	2	6.000	

注: F_{0.05}(2,2) = 19.00。

由表 1,2 结果可知,影响提取工艺的因素主次顺序为 C > D > B > A,其中提取次数(C)对药材提取率影响最大,且具有显著性意义。故确定提取条件 A₁B₃C₂D₃,即用 6 倍量 70% 乙醇回流提取 2 次,每次 1.5 h。

2.4 相关性分析 通过 SPSS 17.0 软件将 9 组样品的葛根素与细胞存活率进行 Pearson 相关系数分

析,结果见表3。

由表3可知, $P = 0.001$,可认为药效学存活率与葛根素含量呈相关性。

表3 葛根素含量与细胞存活率相关性分析

项目	葛根素/%	存活率/%
出膏率 Pearson Correlation	1	0.896
Sig. (2-tailed)		0.001
N	9	0.001
存活率 Pearson Correlation	0.896	1
Sig. (2-tailed)	0.01	
N	9	9

2.5 验证试验 分别称取3份葛根,每份20g,按最佳提取工艺进行提取,测得葛根素平均质量分数5.64%,RSD 1.32%;平均存活率79.27%,RSD 1.43%。说明该优选工艺稳定可行。

3 讨论

葛根是临床常用中药,具有扩张冠状动脉、减慢心率、减少心肌耗氧及降低血液黏稠度等作用,临床疗效确切无毒副作用,是治疗冠心病、心绞痛安全有效的中药^[7]。本试验根据葛根在复方中的作用和制剂的特点,对葛根的提取工艺进行研究。目前多数提取工艺优选中将化学成分含量作为主要考察指标,在临床应用中多以复方用药,某一化学成分与药效之间多无直接的线性关系。本文章通过与功效对应的心肌细胞的细胞活力指标考察以优选提取工艺,可更好地利用葛根资源,为临床应用提供安全、可靠、清晰的应用依据。

为确保葛根药材有效成分的可利用性,必须建立严格的药材提取体系。葛根中葛根素对心脑血管

方面有着很好的治疗作用。通过葛根素的体外药效学,对缺氧复氧模型的大鼠乳鼠心肌细胞有良好的促进作用,通过促进率和葛根素含量综合考虑,筛选出葛根素最佳提取工艺,为临床研究提供进一步依据。同时本试验引入SPSS 17.0软件进行相关性分析,其更好的说明两变量在一定研究范围内的密切程度,并通过相关性分析能进一步验证最佳提取工艺。

[参考文献]

- [1] 仲英,丁香苞,左春旭,等. 高效液相色谱法测定葛根不同季节葛根素的含量与质量[J]. 中草药,1992,23(6):294.
- [2] 易红,杨华. 葛根的品种产地和提取工艺研究进展概况[J]. 中国实验方剂学杂志,2006,12(11):60.
- [3] 王瑞华,兰晓莉,曹国祥,等. 新生SD大鼠心肌细胞培养方法的简化及改良[J]. 心脏杂志,2008,20(2):154.
- [4] 苏敬泽,农一兵,温志浩,等. 黄芪组分配伍对乳鼠肥大细胞肌酸激酶同工酶mRNA表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2008,14(5)40.
- [5] 陈彦静,李建东,黄启福. 三七总皂苷对AngII诱导心肌细胞凋亡的影响[J]. 中国中药杂志,2005,30(10):778.
- [6] 孟宪生,曹爱民,王海波,等. 均匀设计优化半仿生提取葛根苓连汤的工艺研究[J]. 中草药,2006,37(5):710.
- [7] 张剑峰,张丹参. 葛根素的临床应用[J]. 河北北方学院学报,2005,22(5):72.

[责任编辑 全燕]