

以卵巢颗粒细胞增殖率及其雌孕激素分泌能力作为药理活性的指标,能够真实、完整地反映药物对卵巢整体功能的活性作用。从得到的分离部位的实验结果来看,基本重现了宁心红杞胶囊复方的活性,表明所建立的细胞模型具有较高的实用性和重现性。

从实验结果看,16、17号(10%乙醇水溶液)和38、39、40、41号(70%乙醇水溶液)6份活性样品对卵巢颗粒细胞损伤的修复作用显著,而其中部分样品对于改善其雌孕激素的分泌能力并不明显。这说明不同活性指标对应有不同的药效部位,科学地验证了中药复方多靶点、多途径的作用原理,复方中化学成分不是单味药化学成分的简单相加,疗效也不是各单味药简单叠加。

实验证实原复方中促进卵巢颗粒细胞增殖率及其雌孕激素分泌能力药效显著的成分多存在于10%和70%乙醇提取极性段,分别为多糖类和黄酮类成分,为进一步分析研究含量高而得率稳定、药理活性强的有效化学成分提供了实验依据。

从原复方的各味药材研究文献中,并未记载报道任何对卵巢颗粒细胞有活性的成分物质,本实验仅对复方的活性成分明确到了有效部位,需要进一步地研究其来源植物及最佳配比。

参考文献:

[1] 马红,吕晔,孙浩.立春胶囊治疗女性围绝经期综合征74例临床观察[J].天津中医,2002,19(4):55-56.

- [2] 韦镛澄,徐昌芬,马红,等.宁心红杞胶囊对围绝经期综合征的治疗作用[J].药学进展,2004,28(11):521-523.
- [3] 郑真,吕晔,马红,等.宁心红杞胶囊对绝经妇女保健作用的临床研究[J].空军总医院学报,2006,3(22):162-164.
- [4] Liu Daniel, Lu Ye, Ma Hong, et al. A Pilot Observational Study to Assess the Safety and Efficacy of Menoprogen for the Management of Menopausal Symptoms in Chinese Women [J]. *J Altern Complement Med* 2009, 15(1): 79-85.
- [5] 李育,齐栩,王明艳,等.宁心红杞含药血清对大鼠卵巢颗粒细胞凋亡的影响及机制[J].时珍国医国药,2009,20(5):1035-1036.
- [6] 吕晔,马红,肖鹏飞,等.宁心红杞胶囊对老龄雌性大鼠性腺内分泌的影响[J].中国新药杂志,2005,14(3):301-304.
- [7] 武骏,徐立,马红.宁心红杞胶囊对雌性老龄大鼠垂体-卵巢轴功能的影响[J].南京中医药大学学报,2007,23(1):33-35.
- [8] Lu Ye, Ma Hong, Liu Daniel. Pharmacological investigations of the unique herbal formula menoprogen in rats: estrogenic activity and mechanism [J]. *Gynecol Endocrinol*, 2008, 24(3): 161-170.
- [9] 吕晔,马红.宁心红杞胶囊对老龄雌性大鼠卵巢颗粒细胞超微结构的影响[J].解剖学杂志,2006,29(6):171-173.
- [10] 李育,齐栩,武晓群,等.宁心红杞含药血清对大鼠卵巢颗粒细胞超微结构及雌激素分泌的影响[J].江苏中医药,2009,41(3):67-68.
- [11] 马晓芃,戴明,施征,等.针刺对围绝经期大鼠卵巢形态学及血清E₂的影响[J].江苏中医药,2008,40(1):80.

不同提取方法对淫羊藿中总黄酮提取率的比较

余晓晖^{1,2}, 赵磊^{1,2}, 侯嘉¹, 李阳¹, 邵晶^{1,2}

(1. 甘肃中医学院,甘肃兰州730000; 2. 甘肃省高校中(藏)药化学与质量研究省级重点实验室,甘肃兰州730000)

摘要:目的 考察回流、超声、微波、微波辅助回流4种不同提取方法对淫羊藿中总黄酮的提取率。方法 通过HPLC法、紫外分光光度法分析和测定淫羊藿中总黄酮,综合评价4种提取方法的效率。结果 4种提取方法得到的淫羊藿总黄酮成分色谱图具有相似的峰形,用微波辅助回流法提取的总黄酮量最高。结论 微波辅助回流提取的提取率最高。

关键词:淫羊藿总黄酮;提取率;提取方法

中图分类号:R284.2

文献标志码:B

文章编号:1001-1528(2011)07-1257-03

淫羊藿为小檗科植物淫羊藿 *Epimedium brevicornum* Maxim.、箭叶淫羊藿 *Epimedium sagittatum* (Sieb. et Zucc.)、巫山淫羊藿 *Epimedium wushanense* T. S. Ying 等的干燥地上部分,又称仙灵脾,为《中国药典》2010版收载品种。其药用历史悠久,历代本草书籍均有记载,具有补肾壮阳、祛风除湿

等功效,用于治疗阳痿遗精、小便淋漓、盘骨痠软、风湿痹痛等证,为常用补虚壮阳中药^[1]。现代化学研究表明,淫羊藿所含的主要活性成分为淫羊藿总黄酮,具有增加脑血流量和冠脉流量、抗肿瘤、抗氧化和增强机体免疫力等功能^[2]。

在中药提取工艺中,提取物料粒度的选择是非常重要的

收稿日期:2010-06-07

作者简介:余晓晖(1964—),女,高级实验师,研究方向:中药有效成分及质量标准。Tel:(0931)8765394

的。实验室为研究方便,常选用粒度很细的原料;而实际上,由于采用粉碎的原料存在后续过滤难的问题,大批量生产的中药厂一般采用饮片进行提取,由于饮片与溶剂的接触面小,为了达到期望中的提取率,用常规回流提取法往往需要很长时间^[3]。为改善这种情况,需借助新的技术。近年来,在提取领域内微波与超声技术在中药行业中的应用引起人们的日益关注。微波提取机理^[4-5]是在原料与溶剂体系中,植物原料吸收了大部分的微波能,造成原料自身温度的升高,从而使细胞结构产生破坏,同时,外(溶剂)冷内(物料)热使传热与传质同向,加快传递过程的进行。超声提取是在溶剂和样品之间产生声波空化作用,导致溶液内气泡的形成、增长和爆破压缩,使固体样品分散,增大样品与萃取溶剂之间的接触面积,提高目标物从固相转移到液相的传质速率。用微波辅助回流提取淫羊藿总黄酮尚无文献报道。本实验以淫羊藿总黄酮转移率为考察指标,评价这四种提取方法,以期工业提取淫羊藿总黄酮提供更多、更新、更科学的依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 Agilent Technologies 1200 高效液相色谱仪(美国 Agilent 科技公司),包括:在线脱气机,四元梯度泵,自动进样器,恒温柱温箱,DAD 检测器,Agilent 1200 化学工作站;紫外分光光度计(UV-9100 北京瑞利分析仪器公司)、超声提取器(KQ-250TPB 型高频数控超声波)、微波炉(D8023CTL-K4 型)、电子天平(BS124S 北京赛多利斯仪器系统有限公司)。

1.2 试剂药品 淫羊藿药材购于兰州市阿甘镇,经甘肃中医药大学中药生药学实验室林丽高级实验师鉴定为心叶淫羊藿 *Epimedium brevicornum* Maxim.,淫羊藿苷对照品(批号 537-2004)购自中国药品生物制品检定所。其余试剂药品均是分析纯。

2 方法与结果

2.1 样品溶液的制备

2.1.1 回流提取 精密称取淫羊藿药材粗粉 2.0 g,加 80% 乙醇 100 mL,水浴回流提取 2 h,趁热抽滤,滤液于水浴上浓缩至无醇味,放凉,60% 乙醇定容至 100 mL。

2.1.2 超声提取 精密称取淫羊藿药材粗粉 2.0 g,加 80% 乙醇 100 mL,超声提取器中处理 30 min,趁热抽滤。滤液于水浴上浓缩至无醇味,放凉,60% 乙醇定容至 100 mL。

2.1.3 微波提取 精密称取淫羊藿药材粗粉 2.0 g,加 80% 乙醇 100 mL,微波提取器中处理 5 min,趁热抽滤,滤液于水浴上浓缩至无醇味,放凉,60% 乙醇定容至 100 mL。

2.1.4 微波辅助回流提取 精密称取淫羊藿药材粗粉 2.0 g,加 80% 乙醇 100 mL,微波提取器中处理 2 min,水浴回流提取 1 h,趁热抽滤,滤液于水浴上浓缩至无醇味,放凉,60% 乙醇定容至 100 mL。

2.2 供试液的制备^[4] 分别精密量取上述各次提取滤液 10 mL,置于蒸发皿上,水浴蒸干,残渣用甲醇完全溶解后转移至 10 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀。

2.3 HPLC 色谱图的比较

2.3.1 色谱条件^[6] 色谱柱 ZORBAX-EclipsesXDB 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm),流动相 乙腈-水(30 : 70),检测波长 270 nm,体积流量 1.0 mL/min,柱温 25 °C,进样量 10 μL。

2.3.2 HPLC 供试品溶液的制备 分别取 2.2 项下各供试液适量,用 0.45 μm 微孔滤膜过滤,按 2.3.1 项色谱条件进样。HPLC 图谱分别见图 1~4。

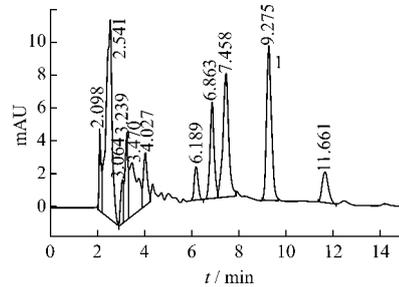


图 1 淫羊藿回流提取黄酮成分 HPLC 色谱
1. 淫羊藿苷

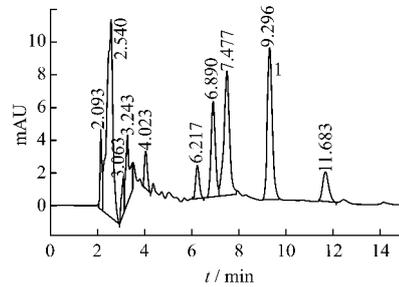


图 2 淫羊藿超声提取黄酮成分 HPLC 色谱
1. 淫羊藿苷

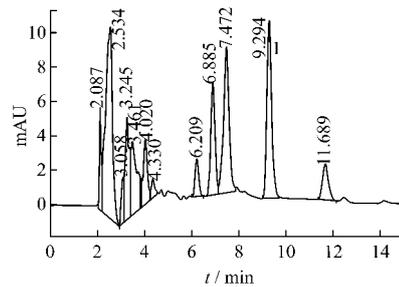


图 3 淫羊藿微波提取黄酮成分 HPLC 色谱
1. 淫羊藿苷

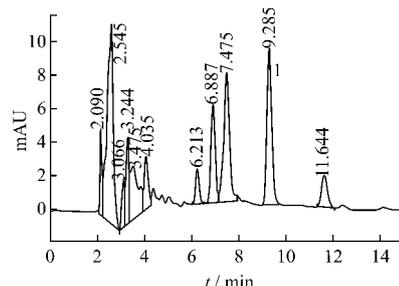


图 4 淫羊藿微波辅助回流提取黄酮成分 HPLC 色谱
1. 淫羊藿苷

因为在 12 min 后基本无色谱峰出现,说明黄酮类成分在 12 min 内基本上已分离出来,所以选择分析时间为 12min。由图 1~4 可以看出,在样品进样浓度和体积相同的条件下,这 4 种提取方法所获得的 HPLC 图谱的出峰数量、相对保留时间基本相同,色谱峰峰形也极其相似。说明这 4 种提取方法所提取出的目标产物基本一致。

2.4 淫羊藿总黄酮测定

2.4.1 对照品溶液制备 精密称取干燥至恒质量的淫羊藿苷对照品 14.3 mg 于 100 mL 量瓶中,以 60% 乙醇定容至刻度。

2.4.2 标准曲线制备 分别吸取 2.4.1 项下的对照品溶液 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL 置于 10 mL 量瓶中(同时吸取 6 mL 的 60% 乙醇作为空白对照),分别加入 1.0 mL 1% AlCl₃^[3] 水浴 40 °C 加热 15 min,放凉,60% 乙醇定容至刻度。在 413 nm 处测吸收度^[7],以吸收值(A)为纵坐标,质量浓度(C)为横坐标,绘制标准曲线,线性方程为: A = 11.301C - 0.0156, r = 0.9994,线性范围为 0.0143 ~ 0.0715 mg/mL,呈现良好的线性关系。

2.4.3 精密度试验 精密吸取 2.4.1 项下对照品溶液 4.8 mL,按 2.4.2 项的方法制备,连续测 5 次吸光度,RSD 为 0.037%。

2.4.4 稳定性试验 取 2.1.1 项下溶液,按 2.4.2 项下方法制备,分别在 0、2、4、8、12、24 h 测定,其 RSD 为 0.75%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.4.5 加样回收 精密称取淫羊藿药材 0.5 g 5 份,分别加入淫羊藿苷对照品适量,按 2.1.1 项下方法提取,按 2.4.2 项下方法制备,结果得平均回收率为 102.5%,RSD 为 2.26%。

2.4.6 样品测定 精密称取淫羊藿药材粗粉 12 份,每份 5.0 g,按 2.1.1 项~2.1.4 项的 4 种方法提取(平行 n = 3),按 2.4.2 项下方法测定,计算各次提取液的质量浓度平均值,比较 4 种方法的提取率。结果见表 1。

表 1 淫羊藿药材中总黄酮的提取率 ($\bar{x} \pm s$ n = 3)

提取方法	质量浓度/($\mu\text{g/mL}$)			$\bar{x} \pm s$	RSD /%	提取率/%
	1	2	3			
回流法	41.85	39.93	41.79	41.19 ± 1.091	2.65	77.6
超声法	35.80	37.22	37.92	36.98 ± 1.080	2.92	68.4
微波法	37.40	38.22	39.32	38.31 ± 0.963	2.51	75.2
微波辅助回流法	45.89	44.79	45.98	45.55 ± 0.663	1.46	85.6

3 讨论

3.1 本实验运用 HPLC 图谱比较、紫外分光光度法测定淫

羊藿总黄酮,比较可知回流提取法、超声提取法、微波提取法、微波辅助回流提取法所得到的目标产物基本一致,紫外分光光度法测定 4 种提取方法提取出的淫羊藿总黄酮,微波辅助回流提取法提取率最高。由实验结果可知,这 4 种方法对淫羊藿中总黄酮类成分的提取效果相似,可以用微波辅助回流提取法取代传统的单纯以醇回流提取淫羊藿中总黄酮的提取法。

3.2 用微波辅助回流提取淫羊藿总黄酮尚无文献报道。微波技术应用于植物细胞破壁,可大大提高收率。从 4 种提取方法看,微波 5 min 提取率已基本接近回流 2 h 提取的效果,提取时间大大缩短;超声提取法虽较回流提取法和微波辅助回流提取法时间短,但提取率较低;回流提取法虽较单纯超声和微波提取法提取率高,但浸提液受热时间较长,不适用于热不稳定成分的提取。本实验采用将微波与回流的优势相结合提取总黄酮,达到良好的提取效果。

3.3 本研究采用淫羊藿对照品和淫羊藿总黄酮与三氯化铝甲醇显色,在 413 nm 测定,此方法是利用黄酮类化合物 5-羟基和 4-酮基可与三氯化铝形成络合物,使最大吸收波长向红偏移,其他非黄酮类化合物无此特性,从而消除了其他成分的干扰。中国药典 2010 年版一部“淫羊藿”总黄酮测定项下的测定方法是直接以淫羊藿苷对照品和淫羊藿总黄酮加甲醇溶解后在 270 nm 测定,此方法中非黄酮类化合物在此也多有光吸收,干扰黄酮类化合物定量测定的准确性。另通过预实验证实,药典方法高于三氯化铝甲醇显色测定的淫羊藿总黄酮量。因此本实验没有采用药典方法测定淫羊藿总黄酮,而用三氯化铝甲醇显色测定淫羊藿总黄酮。

参考文献:

[1] 刘江虹,沈连生.淫羊藿的研究进展[J].北京中医学院学报,1993,16(1):29.

[2] 李梨,周岐新,石京山,等.淫羊藿苷药理作用研究进展[J].中国药房,2005,16(12):952.

[3] 徐任生,陈仲良.中草药有效成分的提取和分离[M].2版.上海:上海科学技术出版社,1989:21.

[4] 郝金玉,韩伟,邓修.新鲜银杏叶经微波辅助提取后微观结构的变化[J].中草药,2002,33(8):739.

[5] 郝金玉,黄若华,邓修,等.微波萃取西番莲籽的研究[J].华东理工大学学报,2001,27(2):117.

[6] 伍庆,周宁,冯泽熹,等.HPLC测定仙灵骨葆胶囊中淫羊藿苷和淫羊藿定C含量[J].中成药,2009,31(8):1121-1123.

[7] 葛淑兰.淫羊藿的提取纯化工艺研究[D].山东中医药大学,2000,9:6-7.