

不同方法提取的元胡白芷产物中相关药效成分及镇痛作用的比较

刘群¹, 黄欣², 荆俊丽¹, 苏乐群^{2*} (1.山东大学药学院, 济南 250012; 2.山东省千佛山医院药学部, 济南 250014)

摘要: 目的 对二氧化碳超临界萃取(CO₂-SFE)和醇回流方法所提取的元胡白芷两种不同产物进行比较。方法 采用固含量、薄层色谱(TLC)、高效液相(HPLC)和不同的大鼠疼痛模型, 从相关药效成分、提取物镇痛等角度对两种提取方法所得的产物进行比较。结果 CO₂-SFE 法所得萃取物的量约为醇回流法的 1/4, 纯度为后者的 6~9 倍; CO₂-SFE 法的提取物的镇痛作用强于醇回流法, 且对血中疼痛物质的影响优于醇回流法。结论 在元胡白芷的提取上, CO₂-SFE 明显优于醇回流技术, 适宜进一步推广应用。

关键词: 元胡; 白芷; 二氧化碳超临界萃取; 醇回流提取

中图分类号: R284.2

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2012)05-0415-04

Comparison of Products from *Corydalis Rhizama* and *Angelica Dahuricae Radix* with Different Extraction Methods on Active Components and Analgesic Effects

LIU Qun¹, HUANG Xin², JING Junli¹, SU Lequn^{2*} (1.School of Pharmaceutical Sciences of Shandong University, Ji'nan 250012, China; 2.Pharmaceutical Department, Shandong Province Qianfoshan Hospital, Ji'nan 250014, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To compare the two different extracting methods:the CO₂-SFE and the alcohol refluxing method, on extraction of *Corydalis Rhizama* and *Angelica dahuricae Radix*. **METHODS** TLC, HPLC were used to determine the extracting efficiency with the active components yield; the analgesic experiments were used to explore the differences in the analgesic effect between the two extraction methods. **RESULTS** CO₂-SFE had 1/4 extract yield of refluxing method, but its purity was 6~9 times higher than refluxing method. It had better analgesic effect in the experimental models and had better effects on pain-related substances. **CONCLUSION** To extract *Corydalis Rhizama* and *Angelica dahuricae Radix* by SFE is more efficient and feasible than the traditional alcohol refluxing method.

KEY WORDS: *Corydalis Rhizama*; *Angelica dahuricae Radix*; CO₂-SFE; alcohol refluxing method

元胡止痛片由元胡和白芷两味中药组成, 临床用于气滞血瘀的胃痛、胁痛、头痛及痛经等, 该方以其组方简单、疗效确切被收载于 1985 年及以后各版中国药典。然而, 现有的元胡白芷制剂多采用传统的醇回流方法提取, 费时、消耗大量溶剂、易残留有机溶媒, 而且高温提取易损失其中不耐热的成分。CO₂-SFE^[1]具有低温萃取、高效快速、无有机溶剂残留等优点, 已作为一种新型的提取方法, 用于药物的研究开发, 尤其适用于中药的提取精制。笔者已经建立使用 CO₂-SFE 提取元胡、白芷有效成分的方法, 本研究将从相关药效成分、药效学及体内物质变化的角度与醇回流提取产物进行比较, 以期对 CO₂-SFE 法进行全面客观的评价。

1 不同提取方法对元胡和白芷有效成分的影响

1.1 材料

延胡索乙素(THP, 中国药品生物制品检定所,

供含量测定用, 批号: 200320); 欧前胡素(IMP, 中国药品生物制品检定所, 供含量测定用, 批号: 200206); 异欧前胡素(iso-IMP, DELTA 天然有机化合物信息中心, 批号: 20030624, 供含量测定用)。元胡、白芷均购自济南药业集团, 由山东省千佛山医院药学部刘逢芹主任药师鉴定为罂粟科植物延胡索 *Corydalis yanhusuo* W.T.Wang 和伞形科植物白芷 *Angelica dahurica*(Fisch.ex Hoffm.)。根据笔者前期研究^[2], 参考文献资料^[3-4], 按照表 1 和表 2 中的条件分别用 CO₂-SFE、醇回流法对元胡、白芷生药材进行提取, 浓缩干燥制得。

1.2 方法

1.2.1 固体物含量的比较 元胡、白芷经两种方法提取后, 提取物经干燥至恒重后, 称重。

1.2.2 薄层色谱图分析 取元胡的 CO₂-SFE 萃取物、醇回流提取物及 THP 对照品适量, 加甲醇溶解。点于硅胶 G 薄层板上, 以环己烷-乙酸乙酯

基金项目: 山东省科技攻关计划项目(2007GG2NS02053)

作者简介: 刘群, 女, 硕士生 Tel: 15216408459 E-mail: 15216408459@126.com *通信作者: 苏乐群, 男, 教授, 主任药师 Tel: (0531)89268366 E-mail: slequn@126.com

(2:1)为展开剂展开,取出晾干,置紫外光灯(365 nm)下检视。

表 1 CO₂-SFE 提取元胡、白芷

Tab 1 Extraction of *Corydalis yanhusuo* and *Angelica dahurica* by CO₂-SFE

中药品种	相关参数				其 他
	萃取釜	分离釜 I	分离釜 II	萃取时间	
元胡	45 MPa 60 ℃	50 ℃	40 ℃	1.4 h	CO ₂ 流量 20 L·h ⁻¹ , 改性剂为无水乙醇
白芷	35 MPa 60 ℃	50 ℃	40 ℃	3.0 h	

表 2 醇回流法提取元胡白芷

Tab 2 Extraction of *Corydalis yanhusuo* and *Angelica dahurica* by the alcohol refluxing method

中药品种	第一次提取	第二次提取
元胡	4 倍量乙醇, 2 h	3 倍量乙醇, 1.5 h
白芷	4 倍量乙醇, 1 h	4 倍量乙醇, 1 h

取白芷的 CO₂-SFE 萃取物、醇回流提取物及 IMP 和 iso-IMP 的对照品适量,加甲醇溶解。点于硅胶 G 薄层板上,以石油醚(30~60 ℃)-乙醚(3:2)为展开剂,展开,取出晾干,置紫外光灯(365 nm)下检视。

1.2.3 高效液相色谱分析 延胡索乙素测定的色谱条件:色谱柱: Phenomenex 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-水-三乙胺(70:30:0.3), 36%乙酸调 pH 至 6.3; 流速: 1 mL·min⁻¹; 检测波长: 280 nm; 柱温: 30℃; 进样量: 20 μL; 灵敏度: 0.01AUFS。

取元胡 CO₂-SFE 萃取物和醇回流提取物适量,甲醇溶解定容后经微孔滤膜过滤,用上述条件测定两种提取物中延胡索乙素的含量。

香豆素类测定的色谱条件:色谱柱: Phenomenex 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-水(70:30); 流速: 1 mL·min⁻¹; 检测波长: 248 nm; 柱温: 30 ℃; 进样量: 20 μL; 灵敏度: 0.01AUFS。

取白芷 CO₂-SFE 萃取物和醇回流提取物适量,甲醇溶解定容后经微孔滤膜过滤,用上述方法测定两种白芷提取物中欧前胡素和异欧前胡素的含量。

1.3 结果

1.3.1 固体物含量的比较 CO₂-SFE 法与醇回流提取法固含物及有效成分含量结果见表 3。

表 3 CO₂-SFE 法与醇回流提取法固含物及有效成分含量
Tab 3 Comparison of extraction by CO₂-SFE and alcohol refluxing

固含物及含量	CO ₂ -SFE 法	醇回流法
元胡固含物(g·100 g ⁻¹ 生药)	0.40	1.58
白芷固含物(g·100 g ⁻¹ 生药)	1.34	8.69
THP 含量(mg·g ⁻¹ 生药)	0.601	0.260
IMP 含量(mg·g ⁻¹ 生药)	1.141	1.113
iso-IMP 含量(mg·g ⁻¹ 生药)	0.613	0.607

1.3.2 TLC 分析 在选定的展开条件下, THP 的比移值(Rf)为 0.31, IMP 和 iso-IMP 的 Rf 值分别为 0.33 和 0.57。两种提取方法所得斑点一致,均呈现主要的药效成分斑点。结果见图 1 和图 2。

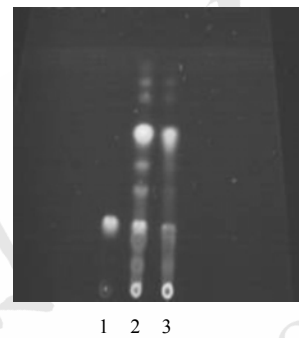


图 1 元胡药材不同提取方法提取物的鉴别
1-延胡索乙素; 2-CO₂-SFE 法提取物; 3-醇回流法提取物

Fig 1 TLC of *Corydalis yanhusuo* by different extraction methods

1-tetrahydropalmatine; 2-extract by CO₂-SFE; 3-extract by alcohol



图 2 白芷药材不同提取方法提取物的鉴别

1-欧前胡素; 2-异欧前胡素; 3-CO₂-SFE 提取物; 4-醇回流提取物

Fig 2 TLC of *Angelica dahuricae* by different extraction methods

1-imperator; 2-isoimperator; 3-extract by CO₂-SFE; 4-extract by alcohol

1.3.3 HPLC 分析 两种提取方法所得提取物的 HPLC 图谱见图 3 和图 4。由色谱图可知, CO₂-SFE 所得的提取物较纯净, 所含的杂质少。表 2 中同时列出了主要有效成分的含量, 可看出 CO₂-SFE 对有效成分的提取率明显高与醇回流提取。

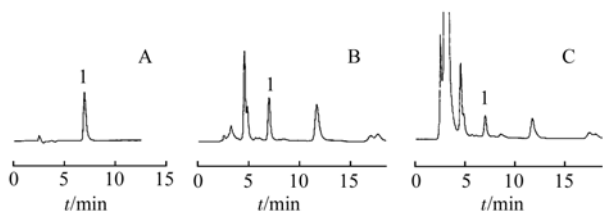


图3 元胡药材不同提取方法提取物 HPLC 图

A-延胡索乙素对照品; B-CO₂-SFE 法提取物样品; C-醇回流提取物样品; 1-THP

Fig 3 HPLC of *Corydalis yanhusuo* by different extraction methods

A-reference; B-sample by SFE; C-sample by alcohol refluxing; 1-dl-tetrahydropalmatine(THP)

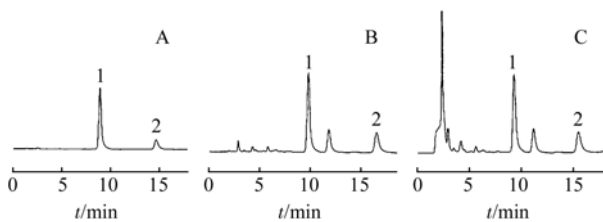


图4 白芷药材不同提取方法提取物 HPLC 图

A-欧前胡素和异欧前胡素对照品; B-CO₂-SFE 法提取物样品; C-醇回流提取物样品; 1-IMP; 2-iso-IMP

Fig 4 HPLC of *Angelica dahurica* by different extraction methods

A-references; B-sample by SFE; C-sample by alcohol refluxing; 1-imperator; 2-isoisperator

2 不同提取方法对元胡白芷镇痛作用的影响

2.1 动物

Wistar 大鼠, ♂ ♀, 体质量 180~220 g, 由山东省中医药大学实验动物中心提供, 实验动物合格证号 SCXK(鲁)20060099。

2.2 药物和试剂

取“1.1”项下元胡、白芷 CO₂-SFE 提取物和醇回流提取物, 临用时按中国药典 2010 年版一部元胡止痛方中元胡白芷的 2:1 配比, 用 0.5%的吐温 80 配制元胡白芷复方药液待用, 其中元胡生药量均为 1.2 g·kg⁻¹; 大鼠前列腺素 F_{2α} 和前列腺素 E₂ ELISA 试剂盒(R&D 分装); β-内啡肽放射性免疫试剂盒(第二军医大学神经生物学教研室)。

2.3 方法

2.3.1 不同提取物对大鼠痛经模型的影响 Wistar 大鼠, ♀, 随机分为 4 组: 空白组、模型组、CO₂-SFE 组、醇回流组。参照文献[5]方法建立大鼠痛经模型: 除空白组大鼠外, 其余大鼠连续 10 d 皮下注射苯甲酸雌二醇(第 1 天和第 10 天为 0.5 mg·只⁻¹·d⁻¹, 余日均为 0.2 mg·只⁻¹·d⁻¹), 末次给药 40 h 后, 腹腔

注射缩宫素 2 U·只⁻¹。从给药的第 5 天开始, 各组灌胃给予相应的药物, 每天 1 次, 连续 7 d。注射缩宫素后记录 20 min 内动物扭体反应的发生次数。之后水合氯醛麻醉大鼠后固定, 下腔静脉取血, 离心后取血清, 按 ELISA 试剂盒说明测定前列腺素的含量。

2.3.2 不同提取物对大鼠福尔马林模型的影响

Wistar 大鼠, ♂, 随机分为 4 组: 空白组、模型组、CO₂-SFE 组、醇回流组。分别每天灌胃 0.5%的吐温 80 溶媒或不同提取方法配制的复方药液连续 7 d(吗啡组于其他组末次给药 1.5 h 后腹腔注射药物)。末次给药 40 min 后, 各组大鼠于左足足底皮下注射 5%甲醛溶液 75 μL(空白组给予生理盐水)。采用 Abbott^[6]推荐的方法, 将大鼠缩腿舔足持续时间之和作为疼痛反应的指标。记录大鼠注射福尔马林后 0~5 min(第 I 时相)和 25~30 min(代表第 II 时相)的疼痛反应时间。30 min 后, 水合氯醛麻醉大鼠后固定, 下腔静脉取血, 2%EDTA 抗凝, 离心后取血浆按放免试剂盒说明测定 β-内啡肽(β-endorphin, β-EP)的含量。

2.4 结果

2.4.1 不同提取物对大鼠痛经模型的影响 CO₂-SFE 与醇提取的药液同时用于痛经模型时, CO₂-SFE 组扭体反应的发生率和扭体次数要低于醇提取组; 而 CO₂-SFE 组血清中前列腺素的含量值更加接近于空白组的含量, 与模型组相比具有统计学差异。结果见表 4 和表 5。

表 4 痛经模型扭体反应的发生率及扭体次数(n=6, $\bar{x} \pm s$)

Tab 4 Comparison of scores in analgesia in rats(n=6, $\bar{x} \pm s$)

分 组	扭体发生率/%	20 min 内扭体次数
CO ₂ -SFE 组	40	4.51±0.71
醇提取组	60	10.02±6.24
模型组	80	16.00±3.67
空白组	0	0

表 5 痛经模型大鼠前列腺素的含量(n=6, $\bar{x} \pm s$)

Tab 5 Comparison of the PGs content of blood in rats(n=6, $\bar{x} \pm s$)

分 组	PGF _{2α} 的含量/ ng·mL ⁻¹	PGE ₂ 的含量/ ng·mL ⁻¹	PGF _{2α} /PGE ₂
CO ₂ -SFE 组	270.11±24.08 ¹⁾	721.85±79.56 ¹⁾	0.3770±0.0394 ²⁾
醇提取组	296.70±87.18	641.81±147.63	0.5189±0.2058 ¹⁾
模型组	353.86±50.26	601.69±65.76	0.5689±0.0845
空白组	228.33±16.10 ²⁾	793.00±199.32 ²⁾	0.2898±0.0417 ²⁾

注: 与模型组相比, ¹⁾P<0.05, ²⁾P<0.01

Note: Compared with model group, ¹⁾P<0.05, ²⁾P<0.01

2.4.2 不同提取物对大鼠福尔马林模型的影响

大鼠灌胃给予元胡白芷配方药物后,能减少因注射福尔马林引起的第Ⅱ时相的疼痛反应(即缩腿舔足等行为)的持续时间,且CO₂-SFE组镇痛作用显著优于醇提取组;与空白组相比,模型组的β-EP的含量明显升高($P<0.01$),元胡白芷配方药物能够对这种升高有一定的降低作用,CO₂-SFE组的作用更强:与模型组相比,CO₂-SFE组β-EP的含量降低了36%,醇提取组中的β-EP的含量降低约25%。结果见表6和表7。

表6 各组行为学(缩腿舔爪时间)的变化($n=6, \bar{x} \pm s$)

Tab 6 Comparison of scores in analgesia in formalin test rats of every group($n=6, \bar{x} \pm s$)

分 组	0~5 min/s	25~30 min/s
CO ₂ -SFE 组	69.3±12.68	46.2±31.74 ¹⁾
醇提取组	69.0±8.87	81.5±14.39
空白组	10.0±5.29 ¹⁾	0
模型组	126.4±67.24	143.2±69.74

注:与模型组相比,¹⁾ $P<0.01$

Note: Compared with model group, ¹⁾ $P<0.01$

表7 福尔马林疼痛模型大鼠血浆中β-EP的影响($n=6, \bar{x} \pm s$)

Tab 7 Comparison of the β-EP content of blood in rats of the formalin test($n=6, \bar{x} \pm s$)

分 组	血浆中β-EP的含量/ng·mL ⁻¹
CO ₂ -SFE 组	570.53±60.61 ¹⁾
醇提取组	668.43±137.79
空白组	666.20±25.64 ¹⁾
模型组	891.70±138.16

注:与模型组相比,¹⁾ $P<0.01$

Note: Compared with model group, ¹⁾ $P<0.01$

3 讨论

元胡止痛片是临床常用中成药,其组方包括延胡索、白芷两味中药。笔者结合当前中药现代化的发展趋势,采用现代科学技术——二氧化碳超临界萃取对该方传统的提取方法进行了改进。本研究对该提取方法与传统提取方法进行了全面的比较,一方面通过固含量、TLC、HPLC图谱和相关药效成分含量的比较,发现两种提取方法

所得到的提取物的目标成分一致,但CO₂-SFE法所得萃取物固含量少、纯度高、相关药效成分的提取率要远远高于醇提取法;另一方面,将等量的不同方法所得提取物用于大鼠痛经和福尔马林疼痛模型时,可观察到CO₂-SFE法的镇痛效果要显著高于醇提取组。结合实验室前期研究,本实验又进一步对血中相应的疼痛物质含量进行了分析,发现CO₂-SFE组对相应因子的影响都要优于醇提取组。因此,发挥相同的镇痛作用时,CO₂-SFE法所用的药量要低于醇回流法。

元胡止痛糖衣片是应用早而广泛的一种剂型,存在着崩解时间长、溶出速度慢、服用量大的缺点。虽然目前研制出多种其他剂型,如口服液、软胶囊剂、滴丸剂等,对药物的溶出有了一定的改善作用,但因生药材多仍采用传统的醇回流提取的方法,使得提取物中掺有大量无效水溶性成分,导致制剂的服用量大,药物崩解性差。笔者采用CO₂-SFE改进了元胡、白芷的提取方法,元胡、白芷经CO₂-SFE后有效成分含量低,提取物中无效水溶性成分少,能有效降低服用量,适用于元胡、白芷现代剂型的开发,是比较理想的提取技术,适宜进一步推广应用。

REFERENCES

- [1] LI X H, SUN H. Research progress of supercritical fluid extraction in Chinese medicine extraction and separation [J]. Asia-Pacific Tradit Med(亚太传统医药), 2011, 7(2): 154-156.
- [2] HUANG X. Study on yuanhuzhitong dispersible tablet [D]. Shandong: School of Pharmaceutical Sciences of Shandong University, 2005.
- [3] WANG D Z, JING S L. A study on extraction of corydalis b in Rhizoma Corydalis Yanhusuo with sfe and other methods [J]. J Nanjing Univ Tradit Chin Med (Nat Sci)(南京中医药大学学报:自然科学版), 2003, 19(6): 356-357.
- [4] LANG M J, YANG G D, HE L C. Solvent extraction methods of imperatorin in Radix Angelicae Dahurica [J]. Chin Tradit Pat Med(中成药), 2000, 22(12): 829-823.
- [5] JI B, ZHANG L F, ZHU J. On building the dysmenorrhea model and assessment methods [J]. Chin Pharmacol Bull(中国药理学通报), 2008, 24(6): 711-714.
- [6] ABBOTT F V, FRANKLIN K B, WESTBROOK R F. The formalin test: Scoring properties of the first and second phases of the pain response in rats [J]. Pain, 1995, 60(1): 91-102.

收稿日期: 2011-09-07