

小叶锦鸡儿总黄酮提取工艺研究及对脑缺血再灌注损伤大鼠的作用

康亚男¹, 李媛媛^{1,2}, 岳永花¹, 李先荣^{1*}, 石任兵², 倪艳¹

1. 山西省中医药研究院, 山西 太原 030012

2. 北京中医药大学, 北京 100102

摘要: **目的** 优化小叶锦鸡儿黄酮类成分的提取工艺, 探讨其对实验性脑缺血再灌注损伤大鼠的保护作用。**方法** 采用正交试验, 以芦丁作为对照, 以总黄酮量为指标考察小叶锦鸡儿总黄酮的最佳提取工艺; 采用大脑中动脉阻断(MCAO)制备大鼠局灶性脑缺血再灌注模型, ig 给药 4 周后, 观察小叶锦鸡儿总黄酮对 MCAO 模型大鼠学习记忆能力的影响, 并测定其血流变学各项指标。**结果** 正交实验结果表明, 各因素作用影响主次顺序为: 液固比 > 乙醇浓度 > 浸提时间 > 浸提温度。小叶锦鸡儿总黄酮能提高 MCAO 模型大鼠的学习记忆能力, 降低血浆黏度(η)、血小板聚集率(PAgT)、红细胞聚集指数(EAI)、红细胞刚性指数(IR), 并增加红细胞变形指数(DI)。**结论** 确定了总黄酮最佳提取工艺为乙醇浓度 60%, 浸提时间 5 h, 液固比 40 : 1, 浸提温度 60 °C。小叶锦鸡儿总黄酮对脑缺血再灌注损伤具有脑保护作用, 这可能与小叶锦鸡儿总黄酮降低血黏度有关。

关键词: 小叶锦鸡儿总黄酮; 提取; 大脑中动脉阻断; 脑缺血再灌注; 学习记忆能力

中图分类号: R284.2 R743.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674 - 6376 (2013) 01 - 0022 - 04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2013.01.006

Extraction technology of total flavonoid from *Caragana microphylla* and its effect on cerebral ischemia-reperfusion injury in rats

KANG Ya-nan¹, LI Yuan-yuan^{1,2}, YUE Yong-hua¹, LI Xian-rong¹, SHI Ren-bing², NI Yan¹

1. Shanxi Academy of Traditional Chinese Medicine, Taiyuan 030012, China

2. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China

Abstract: Objective To optimize the extraction technology of total flavonoid from *Caragana microphylla* (TFCM) and to explore the protective effect on cerebral ischemia-reperfusion injury in rats. **Methods** The optimum extraction technology was detected by orthogonal test with rutin as control and with the content of TFCM as an indicator. The middle-cerebral-artery-occlusion (MCAO) was used to induce the focal cerebral ischemia-reperfusion injury model of rats. The influence on the ability of learning and remembering and the effect on hemorheology were observed after ig administration with TFCM for four weeks. **Results** The result of orthogonal experiment indicated that the order of factors which affected the extraction was as follows: liquid-solid ratio > concentration of ethanol > extracting time > extracting temperature. TFCM could improve the ability of learning and remembering, decrease the levels of blood viscosity (η), platelet aggregation rate (PAgT), erythrocyte aggregation index (EAI), and erythrocyte rigidity index (IR), and increase the level of erythrocyte deformation index (DI). **Conclusion** The optimum extraction conditions are as follows: extracting for 5 h at 60 °C with the ratio of 60% ethanol to medicinal herbs (40 : 1). TFCM could protect the brain of the model rat with focal cerebral ischemia-reperfusion; It could be relevant to the role of decreasing blood viscosity.

Key words: total flavonoid from *Caragana microphylla*; extraction; middle-cerebral-artery-occlusion; cerebral ischemia-reperfusion; learning and remembering ability

小叶锦鸡儿 *Caragana microphylla* Lam. 为豆科锦鸡儿属多年生灌木, 俗称“柠条儿”^[1], 全草或花、种子入药, 味苦、性寒, 具有祛风除湿、活血通络、镇静消炎等功效^[2], 主要分布在山西、内蒙

古、陕西、甘肃等地。民间用于治疗骨髓炎、风湿性关节炎。前期研究工作发现, 小叶锦鸡儿醇提物具有抗炎、改善血流变、降血压和清除自由基等药理作用。本实验进一步阐明小叶锦鸡儿总黄酮

收稿日期: 2012-12-07

作者简介: 康亚男, 女, 山西省中医药研究院在读硕士研究生, 主要从事中药药剂方面的研究。E-mail: 767769475@qq.com

*通信作者 李先荣, 教授, 博士生导师。E-mail: xrli-01@163.com

(TFCM)对缺血再灌注模型大鼠的治疗作用,并初步探讨其作用机制。

1 材料与方法

1.1 药材与实验动物

小叶锦鸡儿采于山西省农科院试验地,药材经山西省中医药研究院李先荣主任药师鉴定为小叶锦鸡儿 *Caragana microphylla* Lam.。

健康雄性 Wistar 大鼠 85 只,体质量(220±20)g,购自山西省中医药研究院实验动物中心(许可证号 SCXK 晋 2010-0002),饲养于清洁恒温环境中,自由饮水进食,适应性饲养 1 周。

1.2 仪器与试剂

TU—1901 双光束紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司),KDC—2046 低速冷冻离心机(科大创新股份有限公司中佳分公司),BS223S 电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司),电热恒温箱(北京市医疗设备厂),医用冷冻冰箱(Sanyo Medical Freezer),双路多功能血流变参数分析仪(重庆麦迪克科技开发有限公司);Morris 水迷宫视频跟踪分析系统(成都泰盟科技有限公司)。

芦丁(中国食品药品检定研究院,批号 100080-200707),所用试剂均为分析纯。阳性对照药:阿司匹林肠溶片,Bayer Schering Pharma,批号 BTA84G6,购自南京建成生物科技有限公司。

1.3 小叶锦鸡儿总黄酮的提取

称取用乙醚提取后的干燥小叶锦鸡儿药材粉末 500 g,按照正交优化设计得到的最佳提取工艺浸提,趁热滤过,合并滤液,减压浓缩至无醇味,加适量蒸馏水溶解,过 AB-8 大孔吸附树脂柱,蒸馏水洗至无色,弃去,再用 60%乙醇洗脱,收集洗脱液,减压浓缩,真空干燥,即得小叶锦鸡儿总黄酮,用紫外可见分光光度法测量其质量分数,结果为(70.7±0.4)%。

1.4 正交设计优化小叶锦鸡儿总黄酮提取工艺

提取工艺条件的优选采用正交实验,以总黄酮量作为考察指标,选取乙醇浓度(A)、提取温度(B)、液固比(C)、提取时间(D)作为考察的4个因素,每个因素各取3个水平,按 $L_9(3^4)$ 表安排正交实验,其各因素水平见表1。

1.5 实验方法

1.5.1 标准溶液的制备 精密称取芦丁对照品 25.0 mg,用 70%乙醇溶解后移至 100 mL 量瓶中定容。

表 1 小叶锦鸡儿总黄酮提取工艺因素水平
Table 1 Factors and levels of TFCM extraction technology

水平	乙醇浓度	提取温度/℃	液固比	提取时间/h
1	50	50	30:1	3
2	60	60	40:1	5
3	70	70	50:1	7

精密吸取 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 mL 分别置于 25 mL 量瓶中,分别加入 5%亚硝酸钠溶液 1.0 mL,放置 6 min,加 10%硝酸铝溶液 1.0 mL,放置 6 min,加 1 mol/L 氢氧化钠溶液 10 mL,用 70%乙醇稀释至刻度,放置 15 min,在 510 nm 下测定吸光度值。用最小二乘法进行线性拟合,得曲线回归方程为 $A=0.1135C-0.1201$ ($r=0.9996$),其中, A 代表吸光度, C 代表总黄酮量。

1.5.2 小叶锦鸡儿总黄酮的测定 精确称取粗提取物样品 0.1 g,按照“1.5.1”项下方法制备样品,以 70%乙醇定容于 50 mL,在相同条件下测定总黄酮。

1.5.3 大脑中动脉阻断(MCAO)动物模型建立^[3] 75 只大鼠采用 Longa 等^[4]的改良线栓法制备大鼠局灶性脑缺血再灌注模型,将预先浸泡在肝素生理盐水中的尼龙线栓从颈总动脉插入,经颈总动脉进入颈内动脉,以颈总动脉分叉处计算进线(18.5±0.5)mm 至大脑中动脉起始部,造成局灶性脑缺血状态,缺血 90 min 后缓慢拔出线栓再灌注,缝合。假手术组除将线栓插入颈内动脉 8 mm 外,其余操作与手术组相同。造模后动物自然苏醒,参照 Longa^[5]的 V 级标准,排除蛛网膜下腔出血者,选取神经功能障碍在 II、III、IV 级的大鼠,常规条件下饲养。

1.5.4 动物分组及给药 由“1.4”项下方法制得小叶锦鸡儿总黄酮(质量分数 70.7%),用蒸馏水配制成 3 个质量浓度(1.25、2.50、5.00 g/mL 生药量)。筛选上述合格的模型 50 只,随机分为 5 组,即模型组,阿司匹林组(12.5 mg/kg),TFCM 低、中、高剂量(25、50、100 g/kg)组,每组 10 只;另取 10 只正常大鼠作为对照组。术后 24 h,按上述剂量给药,每天 1 次,连续 4 周。

1.5.5 Morris 水迷宫定位航行实验及血液测定 给药第 4 周所有实验大鼠进行水迷宫实验,实验前 3 d 适应水池环境,后 4 d 进行正式实验,在每天的固定时间入水实验,将大鼠面朝池壁,从第一象限开始依次投入水中,大鼠自入水起 120 s 内爬上平台的时间记为在该象限平台搜索的潜伏期;若 120 s 没有爬上平台,将其引上平台,则潜伏期记为 120 s。

每个象限结束后,大鼠爬上或被引上平台,休息30 s开始下一象限的实验,4个象限潜伏期的平均值记为当天的隐匿平台潜伏期。

末次给药完成水迷宫实验后,用1%戊巴比妥钠(100 mg/kg)深度麻醉,心脏采血,置抗凝管中,用于测定血液流变学。

1.5.6 统计学分析 实验结果采用SPSS17.0进行统计分析,所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异采用单因素方差分析。

2 结果与分析

2.1 小叶锦鸡儿总黄酮提取工艺的优化

采用 $L_9(3^4)$ 正交实验对小叶锦鸡儿总黄酮的提取工艺进行优化,以总黄酮量为指标进行直观分析,结果见表2。直观分析结果表明各因素作用影响主次顺序为:液固比>乙醇浓度>浸提时间>浸提温度,确定的最佳提取工艺为 $A_2B_1C_2D_3$ 。方差分析结果表明,乙醇浓度、液固比两因素均有显著差异($P<0.05$),浸提时间、浸提温度两因素无显著差异($P>0.05$),对总黄酮提取效果影响不大。综合考虑确定最佳提取条件为 $A_2B_1C_2D_3$,即乙醇浓度60%,浸提时间7 h,液固比40:1,浸提温度50℃。

2.2 验证试验

根据“2.1”项下优化条件进行了3次验证实验,在510 nm处测定其吸光度,代入标准曲线回归方程,换算得到总黄酮得率为 $(1.058 \pm 0.025)\%$,说明该提取工艺稳定可行。

2.3 小叶锦鸡儿总黄酮对模型大鼠学习记忆功能的影响

由表3可见,模型组大鼠学习记忆能力较对照组显著降低($P<0.01$),阿司匹林组较模型组可提

表2 小叶锦鸡儿总黄酮提取工艺正交试验方案与结果

Table 2 Design and results of orthogonal test for TFCM extraction technology

组号	A	B	C	D	总黄酮量/%
	乙醇浓度	浸提温度	液固比	浸提时间	
1	1	1	1	1	0.582
2	1	2	2	2	0.727
3	1	3	3	3	0.935
4	2	1	2	3	0.879
5	2	2	1	1	1.068
6	2	3	1	2	0.643
7	3	1	3	2	1.032
8	3	2	1	3	0.623
9	3	3	2	1	0.766
K_1	0.748	0.831	0.616	0.805	
K_2	0.863	0.806	1.012	0.801	
K_3	0.807	0.781	0.791	0.812	
R	0.115	0.050	0.396	0.011	

高MCAO大鼠的学习记忆能力($P<0.01$);TFCM中、高剂量较模型组均可提高MCAO大鼠的学习记忆能力($P<0.05$ 或 0.01)。

2.4 小叶锦鸡儿总黄酮对模型大鼠血液流变学的影响

由表4、5可见,模型组大鼠血浆黏度(η)、血小板聚集率(PAgT)显著升高、红细胞聚集指数(EAI)、红细胞刚性指数(IR)显著升高,细胞变形指数(DI)降低,较对照组有统计学意义($P<0.01$);阿司匹林组、TFCM低、中、高剂量组较模型组大鼠 η 、PAgT显著降低,红细胞参数EAI、IR显著降低,DI升高,均有统计学意义($P<0.01$),且呈剂量依赖性。

表3 小叶锦鸡儿总黄酮对模型大鼠学习记忆能力的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Effect of TFCM on learning and remembering ability of model rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	平台潜伏时间/s			
		第1天	第2天	第3天	第4天
对照	—	19.25±17.42	18.59±16.00	18.39±12.22	18.17±17.61
模型	—	79.54±22.02**	79.60±23.28**	84.21±19.60**	79.00±34.60**
阿司匹林	0.0125	34.94±27.01 ^{##}	32.41±31.36 ^{##}	31.42±22.40 ^{##}	30.43±33.10 ^{##}
TFCM	25	62.40±32.95	69.49±32.18	61.50±23.66 [#]	64.15±32.23
	50	44.52±27.60 ^{##}	43.03±30.43 ^{##}	41.81±27.88 ^{##}	41.28±30.92 [#]
	100	28.47±18.44 ^{##}	27.51±20.19 ^{##}	27.19±20.66 ^{##}	26.15±27.28 [#]

与对照组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$; 与模型组比较: [#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$, 表4、5同

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs control group; [#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$ vs model group, same as Tables 4 and 5

表4 小叶锦鸡儿总黄酮对模型大鼠血液黏度及血小板聚集率的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Effects of TFCM on blood viscosity and platelet aggregation rate of model rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	黏度/(mPa·s)				PAgT / %
		1·s ⁻¹	30·s ⁻¹	200·s ⁻¹	η	
对照	—	25.46±0.77	5.42±0.31	3.53±0.07	1.32±0.07	45.76±2.96
模型	—	29.78±0.84**	7.89±0.47**	4.46±0.08**	1.96±0.09**	65.69±4.59**
阿司匹林	0.012 5	27.65±0.19##	6.47±0.35##	3.76±0.07##	1.71±0.08##	56.49±3.74##
TFCM	25	28.43±0.90##	7.01±0.35##	3.84±0.06##	1.79±0.10##	59.63±4.06##
	50	26.77±0.74##	6.75±0.42##	3.80±0.07##	1.72±0.11##	57.67±4.31##
	100	25.93±0.97##	6.39±0.46##	3.72±0.06##	1.57±0.10##	55.59±4.58##

表5 小叶锦鸡儿总黄酮对模型大鼠红细胞参数的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 5 Effects of TFCM on red cell parameters of model rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	EAI	IR	DI
对照	—	7.61±0.54	4.46±0.19	0.68±0.06
模型	—	10.75±0.79**	4.89±0.17**	0.45±0.05**
阿司匹林	0.012 5	8.83±0.59##	3.94±0.22##	0.69±0.08##
TFCM	25	8.24±0.63##	3.96±0.23##	0.68±0.05##
	50	8.30±0.92##	3.99±0.22##	0.73±0.06##
	100	7.83±0.58##	3.65±0.17##	0.70±0.07##

3 讨论

小叶锦鸡儿在我国分布广泛,资源丰富,民间用药已证实其良好的活血通络、祛风除湿作用。近年来对其化学成分和药理作用的研究已取得一些进展,本课题组通过前期研究也确定小叶锦鸡儿醇提取物具有抗炎、改善血流变、降血压和清除自由基等药理作用,然而黄酮类成分是否主导上述药理活性有待深入研究。本实验选取小叶锦鸡儿总黄酮作为研究对象,通过正交试验优化提取工艺,通过学习记忆能力和血流变指标观察药物疗效,初步探讨了小叶锦鸡儿的药理作用,为促进小叶锦鸡儿资源的综合利用提供了理论依据。

在脑缺血再灌注时,模型组较对照组大鼠的定位航行逃避时间明显延长,反应迟缓,血流变异常,说明大鼠的大脑机能受到损害,学习记忆能力下降。本实验中小叶锦鸡儿总黄酮给药组定位航行逃避时间和血流变指标均随给药剂量的改变而改变,定位航行逃避时间缩短,η、PAgT及红细胞参数EAI,

IR显著降低,DI升高,上述结果提示小叶锦鸡儿总黄酮能明显改善模型大鼠的学习记忆能力,其作用机制可能与降低血液黏度有关,为进一步研究作用机制提供理论依据。

参考文献

- [1] 牛西午. 柠条研究论文集 [C]. 太原: 陕西科学技术出版社, 2003.
- [2] 杜学武, 郭晓玲, 郭春林, 等. 锦鸡儿治疗类风湿性关节炎临床研究 [J]. 中国民族医药杂志, 1998, 4(2): 12-14.
- [3] 孙国栋, 岳永花, 李先荣, 等. 芪蛭通络胶囊辅助阿司匹林对脑缺血再灌注损伤大鼠的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(17): 202-205.
- [4] 陈奇. 中药药理实验方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006.
- [5] Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. Stroke, 1989, 20(1): 84-91.