

丹参饮不同提取工艺样品对急性心肌缺血模型小鼠的保护作用

舒海燕*, 杨仕林[#](湖北省阳新县人民医院, 湖北 黄石 435200)

中图分类号 R283 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)07-0913-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.07.15

摘要 目的:观察丹参饮不同提取工艺样品对急性心肌缺血模型小鼠的保护作用。方法:取96只小鼠随机分为空白对照(生理盐水)组、模型(生理盐水)组、阳性药物[复方丹参片,4.6 mg(生药)/(kg·d)]组和水提液、超临界CO₂萃取物及超临界CO₂萃取物+药渣水提液的高、中、低剂量[24、12、6 mg(生药)/(kg·d)]组,共12组,每组8只,ig给药,每天1次。第6天给药30 min后,除空白对照组外其余各组小鼠均按20 mg/kg ih异丙肾上腺素复制急性心肌缺血模型,每天1次,连续3 d。观察各组小鼠心电图ST段的变化,快速断头后观察各组小鼠张口呼吸次数及呼吸持续时间,测定血清中肌酸激酶(CK)、乳酸脱氢酶(LDH)的活性。结果:与空白对照组比较,模型组小鼠心电图ST段和血清中CK、LDH活性升高,断头后张口呼吸次数减少、呼吸持续时间缩短($P<0.01$);与模型组比较,各给药组上述指标均得到改善($P<0.01$),且与药物质量浓度呈正相关;超临界CO₂萃取物+药渣水提液组各指标与空白对照组小鼠最为接近。结论:丹参饮不同提取工艺的样品对急性心肌缺血小鼠均具有一定的保护作用,且以超临界CO₂萃取物+药渣水提液样品的保护作用最强。

关键词 丹参饮;心肌缺血;超临界CO₂萃取物;药渣水提液;保护作用;小鼠

Protective Effect of Different Extraction Samples from *Salvia miltiorrhiza* Decoction against Acute Myocardial Ischemia Model Mice

SHU Haiyan, YANG Shilin(Hubei Province Yangxin County People's Hospital, Hubei Huangshi 435200, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To observe the protective effect of different extraction samples from *Salvia miltiorrhiza* decoction on acute myocardial ischemia model mice. METHODS: 96 mice were randomized into blank control group (normal saline), model group (normal saline), positive drug group [Compound *Salvia miltiorrhiza* tablet, 4.6 mg (crude drug)/(kg·d)], high-dose, medium-dose and low-dose groups of water extract, supercritical CO₂ extract and supercritical CO₂ extract+dregs water extract [24, 12, 6 mg (crude drug)/(kg·d)], with 8 mice in each group, 12 groups in total. They were given medicine intragastrically once a day. On sixth day, 30 min after giving drugs, those groups were given isoprenaline 20 mg/kg, ih, to induce myocardial ischemia model except for blank control group, once a day, for consecutive 3 d. Electrocardiogram ST segment variation of mice were observed. The times and duration of buccal respiration were observed after rapid decapitation, and the activities of CK and LDH in serum were determined. RESULTS: Compared with blank control group, electrocardiogram ST segment and the activity of CK and LDH increased in model group, while the times and duration of buccal respiration after rapid decapitation reduced ($P<0.01$); compared with model group, above indicators of medication groups had been improved ($P<0.01$), and were positively correlated to drug concentration; the indicators of supercritical CO₂ extract+dregs water extract group were most close to those of blank control group. CONCLUSIONS: Different extraction samples from *Salvia miltiorrhiza* decoction all have protective effect on acute myocardial ischemia model mice, and the protective effect of supercritical CO₂ extracting+dregs water extracting sample of *Salvia Miltiorrhiza* decoction is best.

KEYWORDS *Salvia miltiorrhiza* decoction; Myocardial ischemia; Supercritical CO₂ extract; Dregs water extract; Protective effect; Mice

丹参饮出自《时方歌括》,是一种活血化瘀的经典方剂,由丹参、檀香、砂仁3味药材组成,具有活血化瘀、行气止痛之功效,主治心痛、胃脘诸痛,临床多用于治疗心律失常、冠心病、心力衰竭等心血管疾病^[1-3]。由于其具有配伍精当、疗效显著等特点,近年来广泛应用于临床,尤其是在心脑血管系统疾病治疗中起着非常重要的作用。现代研究表明,丹参饮能提高小鼠血清中一氧化氮(NO)含量、降低内皮素1(ET-1)含量,作用于冠脉血管可起到扩张冠脉血管的功效,具有抗心肌缺血、保护心肌的作用^[4],为治疗心肌缺血性疾病的良方。

超临界CO₂流体萃取法是一种新兴的提取分离技术,用该技术对经典方剂丹参饮指标成分(原儿茶醛和丹酚酸B等)进行提取,提取效率高,且固形物得率相对较低,在保证药效的

前提下,解决了因固形物含量高而难以成型的问题^[5]。笔者旨在结合药效的方法观察丹参饮水提、超临界CO₂萃取及超临界CO₂萃取结合药渣水提这3种不同提取工艺所制得样品对心肌缺血模型小鼠的保护作用,在保证药效的基础上优选丹参饮的提取工艺,为后续丹参饮的胶囊剂、微丸剂及其他口服新剂型的进一步开发提供实验依据。

1 材料

1.1 仪器

HA420-40-96型超临界CO₂萃取装置(江苏华安科研仪器有限公司);BL-420E型生物机能实验系统(成都泰盟科技有限公司);T6型新世纪紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司);Sigma 3K15型高速低温离心机(美国Sigma公司);ELX800UV型酶标仪(美国Bio-Tec公司);TS-1型恒温摇床(海门市其林贝尔仪器制造有限公司);TP-1102型电子天平、BP121S型分析天平(德国Sartorius集团)。

1.2 药品与试剂

*副主任药师。研究方向:临床药学。电话:0714-7323372。E-mail: l6961248199@qq.com

[#]通信作者:副主任药师。研究方向:临床药学。E-mail: yangshilin66@163.com

复方丹参片(广州白云山和记黄埔中药有限公司,批号:F1A005,规格:0.3 g/片);肌酸激酶(CK)试剂盒、乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号:20150209、20150108);盐酸异丙肾上腺素(ISO)注射液(上海禾丰制药有限公司,批号:41141002,规格:2 ml/支);酒石酸美托洛尔片(珠海经济特区生物化学制药厂,批号:20150101,规格:50 mg/片);10%水合氯醛(天津市科密欧化学试剂有限公司,批号:20141025);其余试剂均为分析纯或化学纯。

1.3 药材与动物

丹参、檀香、砂仁均购自广州大翔药业有限公司,经湖北中医药大学陈科力教授鉴定为丹参为唇形科植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge.的干燥根和根茎,檀香为檀香科植物檀香 *Santalum album* L. 树干的干燥心材,砂仁为姜科植物阳春砂 *Amomum villosum* Lour.的干燥成熟果实,经测定含量均符合2010年版《中国药典》(一部)规定。

SPF级性成熟昆明小鼠,♂,96只,体质量18~25 g,由广东省动物实验中心提供[动物合格证号:SCXK(粤)2008-0002]。

2 方法

2.1 供试品制备

2.1.1 丹参饮水提液 称取丹参、檀香和砂仁(按质量比为6:1:1)适量,加10倍量水,回流提取2次,每次1.5 h,合并提取液,过滤,收集滤液后浓缩至每1 ml相当于1 g生药。贮藏于4℃冰箱中,备用,临用时加水制备成所需质量浓度。

2.1.2 超临界CO₂萃取物 称取丹参、檀香和砂仁(按质量比为6:1:1)适量,粉碎过20目筛,放入萃取釜中,在25 MPa、40℃条件下超临界提取2 h,收集萃取物,除去水分得每1 g样品相当于100 g生药。贮藏于4℃冰箱中,备用,临用时加水制备成所需浓度的混悬液。

2.1.3 超临界CO₂萃取+药渣水提液 称取“2.1.2”项下经超临界CO₂萃取后的药渣,加10倍量水,回流提取2次,每次1 h,滤过,合并滤液,将滤液浓缩至每1 ml相当于1 g生药。然后称取超临界CO₂萃取液供试品适量,再加入对应生药量的药渣水提液,制备成每1 ml相当于1 g生药的合并样品混悬液。贮藏于4℃冰箱中,备用。

2.2 动物分组、造模与给药

将96只小鼠随机分成12组,分别为空白对照组、模型组、阳性药物(复方丹参片)组和水提液组、超临界CO₂萃取物组、超临界CO₂萃取+药渣水提液的高、中、低剂量组,每组8只。造模前5 d,阳性药物组小鼠按4.6 mg(生药)/(kg·d) ig给药^[6],空白对照组和模型组 ig 等体积生理盐水,各样品的高、中、低剂量组均按24、12、6 mg(生药)/(kg·d) ig 给药(给药剂量根据前期预实验而定)^[7]。实验第6天给药30 min后,除正常对照组外其余各组小鼠均 ih 20 mg/kg 的ISO,连续3 d,复制心肌梗死小鼠模型;空白对照组 ih 等体积生理盐水。

2.3 各组小鼠心电图ST段检测

按文献[6]中方法测定小鼠心电图ST段变化。末次给药30 min后,将各组小鼠 ip 0.3%乌拉坦(12 mg/kg)麻醉,仰位固定,四肢皮下插入针状电极,连接生物机能实验系统,记录标准Ⅱ导联心电图ST段变化,观察抬高或降低的幅度。

2.4 各组小鼠耐缺氧能力及血清中CK、LDH活性检测

待上述实验结束各组小鼠再次按“2.2”项下方法给药,30 min后 ih ISO(20 mg/kg),2 h后用剪刀将小鼠的头部快速剪掉,测定张口呼吸持续时间及张口呼吸次数,观察小鼠耐缺氧的能力。在断头的同时颈动脉取血,以离心半径为5 cm、3 500

r/min离心15 min,分离血清,采用酶偶联法测定血清中CK含量,采用连续监测法测定血清中LDH含量,操作严格按照试剂盒说明书进行。

2.5 统计学方法

用SPSS 20.0软件进行数据分析。实验数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用方差分许,两两比较采用t检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 不同提取工艺样品对小鼠心电图ST段的影响

与空白对照组比较,模型组小鼠心电图ST段抬高($P < 0.01$);与模型组比较,各给药组小鼠心电图ST段不同程度降低($P < 0.01$)。各组小鼠心电图ST段检测结果见表1。

表1 各组小鼠心电图ST段检测结果($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Tab 1 Determination results of electrocardiogram ST segment in mice of each group($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量,g(生药)/kg	ST段,mV
空白对照组		0.07 ± 0.05
模型组		0.24 ± 0.02*
阳性对照组	4.6	0.11 ± 0.06 [#]
水提液组	24	0.12 ± 0.02 [#]
	12	0.17 ± 0.02 [#]
	6	0.20 ± 0.05 [#]
超临界CO ₂ 萃取物组	24	0.16 ± 0.04 [#]
	12	0.19 ± 0.02 [#]
	6	0.19 ± 0.05 [#]
超临界CO ₂ 萃取+药渣水提液组	24	0.10 ± 0.20 [#]
	12	0.14 ± 0.03 [#]
	6	0.16 ± 0.02 [#]

注:与空白对照组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较,[#] $P < 0.01$

Note: vs. blank control group,* $P < 0.01$; vs. model group,[#] $P < 0.01$

3.2 各组小鼠快速断头后张口呼吸次数和呼吸持续时间的检测结果

与空白对照组比较,模型组小鼠断头后张口呼吸次数减少、呼吸持续时间缩短($P < 0.01$);与模型组比较,各给药组小鼠张口呼吸次数增加、呼吸持续时间延长($P < 0.01$)。结果表明,丹参饮各提取方法提取物均能提高小鼠的耐缺氧能力。各组小鼠快速断头后张口呼吸次数和呼吸持续时间的检测结果见表2。

3.3 各组小鼠血清中CK、LDH活性的检测结果

与空白对照组比较,模型组小鼠血清中CK、LDH活性升高($P < 0.01$);与模型组比较,各给药组给小鼠血清中CK、LDH活性降低($P < 0.01$),提示丹参饮各提取物对心肌缺血模型小鼠均具有一定的保护作用,且作用大小为:超临界CO₂萃取+药渣水提液组>水提液组>超临界CO₂萃取物组。各组小鼠血清中CK、LDH活性的检测结果见表3。

4 讨论

复方丹参片具有活血化瘀、理气止痛的功效,是治疗心脑血管疾病的常用中成药,也是药理实验证明了的能提高小鼠耐缺氧能力、对急性心肌梗死小鼠具有一定的保护作用的中成药,故在本文中选其为阳性药物。丹参饮水提液中含有丹参素、丹酚酸B及原儿茶醛等药效成分^[7-9],在提取过程中这些成分会随着加热时间延长发生不同程度的变化;檀香、砂仁含有较多挥发性成分^[10-11],用传统的方法进行煎提会损失较多。因此,传统的水煎提取工艺不适用于工业大生产。超临界CO₂萃取技术是一种新型的萃取和分离技术,广泛应用于中药提

表2 各组小鼠快速断头后张口呼吸次数和呼吸持续时间的检测结果($\bar{x} \pm s, n=8$)

Tab 2 Determination results of the times and duration of buccal respiration after rapid decapitation of mice in each group($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量,g(生药)/kg	呼吸持续时间,s	张口呼吸次数
空白对照组		23.05±1.11	16.23±0.96
模型组		17.58±1.57 [*]	10.23±2.01 [*]
阳性药物组	4.6	26.86±2.13 [#]	17.05±2.05 [#]
水提液组	24	25.22±0.46 [#]	16.55±1.22 [#]
	12	23.14±1.20 [#]	15.33±1.03 [#]
	6	22.45±1.34 [#]	14.86±1.91 [#]
超临界CO ₂ 萃取物组	24	24.11±1.21 [#]	15.53±1.52 [#]
	12	22.56±1.42 [#]	14.88±1.53 [#]
	6	22.01±1.18 [#]	14.52±1.70 [#]
超临界CO ₂ 萃取+药渣水提液组	24	27.42±2.01 [#]	17.56±1.34 [#]
	12	24.55±2.11 [#]	16.03±1.76 [#]
	6	24.41±1.20 [#]	15.78±1.98 [#]

注:与空白对照组比较,^{*} $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.01$
Note: vs. blank control group, ^{*} $P<0.01$; vs. model group, [#] $P<0.01$

表3 各组小鼠血清中CK、LDH活性的检测结果($\bar{x} \pm s, n=8$)

Tab 3 Determination results of the activity of CK and LDH in serum of mice in each group($\bar{x} \pm s, n=8$)

分组	剂量,g(生药)/kg	CK,U/ml	LDH,U/L
空白对照组		0.24±0.06	384.40±25.83
模型组		1.93±0.28 [*]	522.55±36.16 [*]
阳性对照组	4.6	0.74±0.06 [#]	391.34±42.05 [#]
水提液组	24	0.58±0.11 [#]	413.08±25.24 [#]
	12	1.20±0.29 [#]	419.13±37.02 [#]
	6	1.41±0.36 [#]	462.75±53.93 [#]
超临界CO ₂ 萃取物组	24	0.64±0.12 [#]	428.25±35.20 [#]
	12	1.27±0.24 [#]	427.38±19.90 [#]
	6	1.47±0.35 [#]	469.88±14.72 [#]
超临界CO ₂ 萃取+药渣水提液组	24	0.43±0.06 [#]	409.55±30.37 [#]
	12	1.16±0.14 [#]	412.25±26.89 [#]
	6	1.31±0.24 [#]	452.25±33.03 [#]

注:与空白对照组比较,^{*} $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.01$
Note: vs. blank control group, ^{*} $P<0.01$; vs. model group, [#] $P<0.01$

取分离工艺中。其工艺可在较低温(35~40℃)条件下进行,大大减少了丹参饮中受热不稳定、挥发性成分的损失,为后续开发研究丹参饮新剂型奠定了基础。

丹参饮在临床上主要应用于血瘀气滞型胸痹心痛。血液在血管能够运行全赖心脏搏动和血管舒缩功能的推动来完成,气滞是血瘀的成因,血瘀是气滞的后果,但血瘀又往往加重气滞。心肌缺血引起的急性心肌缺氧会导致心肌细胞膜损伤,引起心电图ST段抬高或降低,导致心肌细胞中CK、LDH大量泄漏。心肌缺血的程度越高,ST段变化幅度越大,CK、LDH漏出量越多。因此,测定心外膜心电图ST段变化和血清CK、LDH活性可以反映心肌缺血程度^[12-14]。有研究表明,丹参

饮对大鼠急性心肌缺血具有保护作用^[7]。本研究结合药效的方法观察了丹参饮水提工艺样品、超临界CO₂萃取样品及超临界CO₂萃取结合药渣水提工艺样品对心肌缺血小鼠的保护作用。结果发现,上述3种提取工艺样品对小鼠心肌缺血均有一定的保护作用,且超临界CO₂萃取结合药渣水提工艺样品的这种保护作用效果比水提工艺样品和超临界CO₂萃取样品好。

综上,笔者通过本实验进一步验证了丹参饮对心肌缺血小鼠有保护作用,并从药效学的角度验证了临界CO₂萃取结合药渣提取工艺样品的优越性,为丹参饮新剂型新产品的开发利用提供了实验基础。

参考文献

[1] 陈惠,孙朦朦,安然,等.丹参饮在心血管疾病中的应用研究[J].吉林中医药,2013,33(1):27.
[2] 李国英,李征.丹参饮在心血管疾病中的应用[J].辽宁中医学院学报,2005,7(2):172.
[3] 于广莹.丹参饮临床应用举隅[J].中国中医急症,2011,20(8):1365.
[4] 罗千古,周玖瑶,吴俊标,等.丹参饮对心肌缺血小鼠血清ET-1、NO的影响[J].中药材,2011,34(3):432.
[5] 霍鹏,张青,张滨,等.超临界流体萃取技术的应用与发展[J].河北化工,2010,33(3):25.
[6] 王胜,周静,代时宇,等.腊梅叶总黄酮对小鼠心肌缺血损伤的保护作用[J].湖北中医杂志,2014,36(1):4.
[7] 刘方敏,林辉,吴德跃,等.丹参饮水提液酚酸类成分溶出特性及降解动力学研究[J].广州中医药大学学报,2015,32(3):489.
[8] 宋延平,孔令姗,吴静,等.丹酚酸A与丹酚酸B改善大鼠心肌缺血作用比较[J].中国中医药信息杂志,2007,14(9):36.
[9] 杨光义,叶方,黄良永,等.丹参水溶性成分半仿生-生物酶提取方法比较研究[J].中国药师,2011,13(9):1244.
[10] 张生潭,王兆玉,汪铁山,等.中药砂仁挥发油化学成分及其抗菌活性[J].天然产物研究与开发,2011,23(3):464.
[11] 颜仁梁,刘志刚,林励.檀香化学成分研究[J].中药材,2006,29(4):337.
[12] 陈俊萍,李向阳.红花水提物对急性心肌缺血模型大鼠的保护作用研究[J].中国药房,2012,23(19):1742.
[13] 李峰杰,李貽奎.心肌梗死动物模型研究进展[J].中国药理学通报,2013,29(1):6.
[14] 李然,刘立萍,康广盛.丹参饮对大鼠急性心肌缺血的保护作用[J].辽宁中医杂志,2008,35(12):1944.

(收稿日期:2015-06-06 修回日期:2015-08-24)
(编辑:林 静)