

通脉养心方提取工艺优选

徐道情, 耿 彤

天津中新药业集团股份有限公司, 天津 300193

摘要: 目的 优选通脉养心方的提取工艺。方法 使用氯仿诱发小鼠室颤模型和大鼠离体胸主动脉血管环试验结果结合甘草酸含量作为指标, 通过正交试验优化通脉养心方提取工艺, 并进行验证。结果 确定最优提取工艺为 60%乙醇提取 2 次, 第一次 8 倍量水提取 1.5 h, 第二次 6 倍量水提取 1 h。结论 工艺优化后的通脉养心方具有良好药理活性, 呈现量-效关系。

关键词: 通脉养心方; 提取工艺; 心律失常; 胸主动脉环

中图分类号: R943

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376(2012)04-0265-05

Optimization of extraction technology for Tongmai Yangxin Prescription

XU Dao-qing, GENG Tong

Tianjin Zhongxin Pharmaceutical Group Co. Ltd., Tianjin 300193, China

Abstract: Objective To optimize extraction technology of Tongmai Yangxin prescription. **Methods** Animal arrhythmia on mice by chloroform and isolated thoracic aortic ring of rats to observe effects of pharmacological activity and contents of glycyrrhizic acid were used to optimization and verify the extraction process of Tongmai Yangxin prescription. **Results** Optimum extraction conditions were as follows: heating refluxing extracted 2 times with the amount of 60% ethanol for 8 times 1.5 hours and 6 times 1 hour. **Conclusion** Tongmai Yangxin prescription in the optimized extraction technology with significant pharmacological activity, showing the dose-effect relationship.

Key words: Tongmai Yangxin Prescription; extraction technology; arrhythmia; thoracic aortic ring

通脉养心丸为天津中新药业集团股份有限公司乐仁堂制药厂生产, 由炙甘草汤与生脉散化裁而得, 具有益气养阴、通脉止痛之功效, 临床用于治疗冠心病、心绞痛及心律不齐之气阴两虚证, 症见胸痛、胸闷、心悸、气短、脉结代^[1]。本实验根据处方药材主要成分的性质及其药理作用, 设计提取路线, 采用氯仿诱发小鼠室颤试验及大鼠离体胸主动脉血管环试验, 考察通脉养心方不同工艺提取物在药效上的差异。根据试验结果确定提取工艺, 使用正交法进一步优化工艺参数, 并进行药效试验验证。

1 材料

1.1 药材

处方药材均由天津中新药业集团股份有限公司乐仁堂制药厂提供, 经鉴定均为《中国药典》正品药材。

1.2 药品与试剂

甘草酸铵对照品 (批号 110731-200614, 中国

食品药品检定研究院), 无水乙醇 (分析纯, 批号 20111013, 天津市科密欧化学试剂有限公司), 乙腈 (色谱纯, 批号 110723, 天津市科密欧化学试剂有限公司), 盐酸利多卡因注射液 (批号 1008051, 天津金耀氨基酸有限公司), 氯仿 (分析纯, 批号 20110211, 天津市科密欧化学试剂有限公司), 重酒石酸去甲肾上腺素注射液 (批号 1102021, 武汉远大制药集团有限公司), 二甲基亚砜 (分析纯, 批号 20110701, 天津市科密欧化学试剂有限公司), 氯化钠 (天津科密欧化学试剂有限公司, 批号 20110328), 氯化钾 (国药集团化学试剂有限公司, 批号 F20100728), 氯化钙 (天津市北方化玻购销中心, 批号 20050105), 磷酸二氢钾 (国药集团化学试剂有限公司, 批号 F20100610), 硫酸镁 (天津力特吉尔环保技术研究所, 批号 19990614), 碳酸氢钠 (天津科密欧化学试剂有限公司, 批号 20110413), 葡萄糖 (天津市北方天医化学试剂厂, 批号 20060108), 以上试剂均为市售分析纯。

收稿日期: 2012-06-02

作者简介: 徐道情 E-mail: 2273310192@qq.com Tel: (022)27020901

1.3 实验动物

KM 小鼠(雌雄各半), Wistar 大鼠(雄性), 均购于天津市山川红实验动物科技有限公司, 合格证号 SCXK(津) 2009-0001。

1.4 仪器

Agilent 1200 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司), Sartorius BP211D 型分析天平(德国赛多利斯公司), HV-4 离体组织器官恒温灌流系统(成都泰盟科技有限公司)。

2 提取工艺考察

2.1 样品制备

根据传统中医药理论以及处方中各药味的化学成分、药理作用, 设计提取工艺路线, 制备样品。

工艺一: 龟甲加水先煎, 后加入鸡血藤、党参、大枣煎煮 2 次, 滤液浓缩, 加入乙醇, 静置 24 h, 滤过, 滤液备用; 其余地黄等 6 味, 用乙醇浸渍 48 h 后渗漉, 收集渗漉液, 与上述提取液合并, 减压回收乙醇至稠膏, 将阿胶粉碎成细粉, 过筛, 与上述稠膏混合, 干燥, 粉碎成细粉。

工艺二: 龟甲加水先煎, 后加入鸡血藤、党参、大枣、麦冬、地黄煎煮 2 次, 滤液浓缩, 加入乙醇, 静置 24 h, 滤过, 滤液备用; 其余五味子等 4 味, 乙醇提取 2 次, 与上述提取液合并, 减压回收乙醇至稠膏, 将阿胶粉碎成细粉, 过筛, 与上述稠膏混合, 干燥, 粉碎成细粉。

工艺三: 鸡血藤、党参、五味子、大枣、龟甲加水煎煮, 合并滤液, 滤过, 浓缩成稠膏, 其余药材粉碎成细粉, 与稠膏混合均匀, 干燥, 粉碎成细粉。

工艺四: 除阿胶外 10 味药材加水煎煮, 提取液浓缩至稠膏, 阿胶粉碎, 与上述稠膏混合, 干燥, 粉碎成细粉。

2.2 样品中甘草酸定量测定^[1]

2.2.1 色谱条件 色谱柱为 Agilent XDB C₁₈ (250 mm×4.6mm, 5 μm); 流动相为乙腈-水-冰醋酸(42:58:2); 检测波长 254 nm; 体积流量 1.0 mL/min, 理论塔板数按甘草酸峰计算应不低于 8 000。

2.2.2 对照品溶液配制 取甘草酸铵对照品适量, 精密称定, 加稀乙醇制成含甘草酸铵 100 μg/mL 的溶液(折合甘草酸为 97.95 μg/mL), 即得。

2.2.3 供试品溶液配制 取工艺一至工艺四制得的干燥粉碎物约 0.5 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中,

精密加入稀乙醇 25 mL, 密塞, 称定质量, 超声处理 30 min, 放冷, 再称定质量, 用稀乙醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.2.4 测定结果 精密吸取上述供试品溶液与对照品溶液 10 μL, 分别注入液相色谱仪, 记录色谱图。按外标法以峰面积计算样品的含量。各工艺制得样品中甘草酸的质量分数分别为 4.2、5.6、2.7、3.9 mg/g。

2.3 提取工艺确定

通脉养心方为炙甘草汤化裁而来, 甘草为其中主药。同时甘草酸是《中国药典》2010 年版一部“通脉养心丸”、“通脉养心口服液”含量测定项下指标成分。因此, 试验中按照药典方法对 4 个不同工艺制备而成样品进行了甘草酸含量测定。由测定结果可知工艺一、工艺二中甘草酸含量较高, 且出膏率较低。因此决定对工艺一和工艺二制得的样品进行药效对比试验。

3 药效试验对比

3.1 离体试验受试样品配制

离体试验受试样品需要配制成澄清溶液, 因此在离体试验中将通脉养心方提取物均进行再次提取。具体操作方法: 受试样品用 70%乙醇提取 2 次, 提取液合并浓缩, 减压干燥, 再用 60%的二甲基亚砜溶解。

3.2 方法

3.2.1 氯仿诱发小鼠室颤试验^[2-4] KM 小鼠按照体质量随机分组, 即空白对照组, 阳性药利多卡因组(15 mg/kg), 通脉养心方 5、10、20 g 生药/kg 工艺一组和工艺二组, 每组 10 只, 雌雄各半。利多卡因组为尾 iv 单次给药后即时观察。其余各组均为 ig 给药, 每日给药 1 次, 连续给药 14 d。末次给药 1 h 后将小鼠投入倒扣的 500 mL 烧杯中, 烧杯内放一个含氯仿 5 mL 的脱脂棉球(0.5 g), 小鼠呼吸停止立即取出剖开胸腔, 肉眼观察心室颤动发生情况, 计算每组实验动物的室颤发生率。每测试一只小鼠后向棉球中添加 1 mL 氯仿。试验数据采用 SPSS11.5 软件 Fisher 检验进行分析。

室颤发生率=发生室颤动物数/该组别全部动物数

3.2.2 大鼠离体胸主动脉血管环试验^[2, 5] 大鼠断头后, 打开胸腔, 迅速剪下胸主动脉降支, 置于盛有 4℃氧饱和的 K-H 液的培养皿中。冲洗血管内血迹, 剔除多余脂肪和结缔组织, 剪成 3~4 mm 的血管环, 将血管环的一端用不锈钢钩垂直连接在组

织浴槽中,另一端连接张力换能器,使用生物机能系统记录血管环张力的变化。浴槽中 K-H 液保持 37 ℃,持续通 95% O₂ 和 5% CO₂,调节组织灌流系统的张力调节旋钮,给予血管环 2 g 初始张力,平衡 1.5~2 h,每 15 min 更换营养液 1 次。平衡结束后,用去甲肾上腺素(终浓度为 10⁻⁶ mol/L)造成血管收缩,主动脉环稳定后,采用累计加样法在浴槽中加入通脉养心方提取液,累计依次加样使药物终浓度分别为 1.25、2.5、5、10、20 mg 生药/mL。每次加药观察 5 min 后记录张力值。对照组加入相同体积的 60%二甲亚砷溶液。试验数据采用单因素方差分析用 SPSS11.5 软件进行处理。

张力下降率=(给药前张力值-给药后张力值)/给药前张力值

3.3 结果

3.3.1 氯仿诱发小鼠室颤试验 结果表明,通脉养心方不同工艺提取物均可降低氯仿致小鼠室颤的发生率。但 5 g 生药/kg 剂量下,与空白对照组相比,工艺一差异无显著性,工艺二差异有显著性 ($P<0.05$)。结果见表 1。

3.3.2 大鼠离体胸主动脉血管环试验 结果表明,通脉养心方不同工艺提取物均能抑制去甲肾上腺素造成的血管环收缩,表现为张力下降。但 10 mg 生药/mL 剂量下,与空白对照组比较,工艺一差异无显著性,工艺二差异具有极显著性 ($P<0.01$)。结果见表 2。

表 1 通脉养心方不同工艺提取物对氯仿致小鼠室颤的影响

Table 1 Effect of extracts by different techniques of Tongmai Yangxin Prescription on ventricular fibrillation induced by chloroform in mouse

组 别	剂量/(g 生药·kg ⁻¹)	室颤发生率/%
对照	—	100
盐酸利多卡因	15 mg·kg ⁻¹	0**
通脉养心方	工艺一	
	5	60
	10	40*
	20	40*
	工艺二	
	5	50*
	10	50*
	20	40*

与对照组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$

* $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs blank group

表 2 通脉养心方不同工艺提取物对大鼠离体血管环的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 2 Effect of extracts by different techniques of Tongmai Yangxin prescription on vascular ring tension *in vitro* of rats ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组 别	不同剂量 (mg 生药·mL ⁻¹) 下的张力下降率/%				
	1.25	2.5	5	10	20
对照	0.90±0.78	1.63±1.54	4.85±4.80	7.82±6.05	11.51±7.70
通脉养心方工艺一	0.37±0.30	2.69±1.64	6.69±2.88	11.87±6.08	18.90±5.74*
工艺二	0.49±0.56	2.42±0.94	7.22±2.47	14.81±3.03**	25.20±3.76**

与对照组比较: * $P<0.05$, ** $P<0.01$

* $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs blank group

4 正交试验优化通脉养心方醇提组提取工艺

药效试验对比结果显示,在抗实验性心率失常以及舒张血管方面,通脉养心方工艺二的药理作用优于工艺一。使用正交试验,对工艺二醇提组(五味子、甘草、制何首乌、桂枝)提取工艺进行优化。水提组工艺采用《中国药典》2010 年版一部收载的“通脉养心口服液”制法项下的方法,暂不进行考察。

乙醇体积分数、溶剂用量和提取时间是决定提取率的重要因素。在单因素筛选预实验的基础上,按照 L₉(3⁴)正交表安排试验,因素水平见表 3。

取醇提组药材,粉碎成粗粉,称取 9 份,置于圆底烧瓶中,按照表 1 中的试验条件进行提取。试验方法、结果及方差分析见表 4 和 5。

直观分析结果(表 4)表明,影响甘草酸含量的因素中,按重要性次序为: A>C>B。最佳组合为 A₂B₂C₃。方差分析(表 5)结果表明,乙醇体积浓度对甘草酸含量有显著性影响,溶剂用量和提

表 3 因素水平表

Table 3 Factors and levels

水平	因素		
	乙醇体积分数 (A) /%	溶剂用量 (B) /倍	提取时间 (C) /h
1	40	8、6	1.5、1
2	60	10、8	2、1.5
3	80	12、10	2.5、2

表4 正交试验结果

Table 4 Results of orthogonal test

试验号	因素				甘草酸/(mg·g ⁻¹)
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	3.32
2	1	2	2	2	4.15
3	1	3	3	3	4.67
4	2	1	2	3	6.33
5	2	2	3	1	6.52
6	2	3	1	2	6.31
7	3	1	3	2	5.64
8	3	2	1	3	5.49
9	3	3	2	1	5.82
K ₁	4.047	5.097	5.040	5.220	
K ₂	6.387	5.387	5.433	5.367	
K ₃	5.650	5.600	5.610	5.497	
R	2.340	0.503	0.570	0.277	

表5 方差分析

Table 5 Variances analysis

方差来源	偏差平方和	自由度	F	F 临界值	P
A	8.589	2	76.687	19.000	<0.05
B	0.383	2	3.330	19.000	
C	0.511	2	4.443	19.000	
D (误差)	0.12	2			

取时间对结果无显著性影响。因此结合直观分析, 确定最佳提取工艺为: 第一次加 8 倍量 60%乙醇提取 1.5 h, 第二次加 6 倍量 60%乙醇提取 1 h。

5 最佳提取工艺药效验证

5.1 受试样品配制

按照“4.2”中确定的最优工艺制备通脉养心样品, 并配置成离体受试样品, 配制方法同“3.1”。

5.2 氯仿诱发小鼠室颤试验

试验方法同 3.2.1。结果表明, 10、20 g 生药/kg 通脉养心方最佳提取工艺提取物可以降低氯仿致小鼠室颤的发生率, 与空白对照组相比, 差异有显著性 ($P<0.05$ 、 $P<0.01$), 呈现量-效关系。结果见

表 6。

5.3 大鼠离体胸主动脉血管环试验

试验方法同 3.2.2。5、10、20 mg 生药/mL 通脉养心方最佳提取工艺提取物能抑制去甲肾上腺素造成的大鼠离体胸主动脉血管环的收缩, 表现为张力下降。与对照组比较, 具有显著性差异 ($P<0.05$ 、 $P<0.01$), 呈现量-效关系。结果见表 7。

表6 通脉养心方最佳提取工艺提取物对氯仿诱发小鼠室颤的影响 ($n=10$)

Table 6 Effect of optimum extraction of Tongmai Yangxin Prescription on ventricular fibrillation induced by chloroform in mouse ($n=10$)

组别	剂量/(g 生药·kg ⁻¹)	室颤发生率/%
对照	—	100
盐酸利多卡因	15 mg·kg ⁻¹	0**
通脉养心方	5	60
	10	50*
	20	30**

与对照组比较: * $P<0.01$, ** $P<0.05$

* $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs blank group

表7 通脉养心方最佳工艺提取物对离体大鼠胸主动脉血管环的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 7 Effect of optimum extraction of Tongmai Yangxin Prescription on vascular ring tension *in vitro* of rats

组别	不同剂量 (mg 生药·mL ⁻¹) 下的张力下降率/%				
	1.25	2.5	5	10	20
对照	2.70±2.45	7.75±2.96	9.26±1.87	14.13±4.70	15.66±5.65
通脉养心方	4.85±3.99	10.22±6.72	18.06±10.98*	26.01±12.61*	34.51±18.81**

与对照组比较: * $P<0.01$, ** $P<0.05$

* $P<0.01$, ** $P<0.05$ vs blank group

6 讨论

通脉养心丸由炙甘草汤与生脉散化裁而得,方中用炙甘草益气养心为主药,党参、大枣益气补脾养心,再辅以滋养阴血、活血通脉、温阳通脉的药物,诸药配合达到益气养阴、通脉止痛之功效,临床用于治疗冠心病、心绞痛及心律不齐之气阴两虚证,症见胸痛、胸闷、心悸、气短、脉结代。现代药理研究表明,通脉养心丸具有抗心肌缺血、抑制大鼠实验性血栓形成的作用^[6],且对实验性心律失常具有保护作用^[4]。

经前期试验发现,通脉养心方具有降低氯仿诱发小鼠室颤发生率及抑制去甲肾上腺素造成的大鼠离体胸主动脉血管收缩的药理作用。本实验采用以上两个药理实验模型对通脉养心方的不同工艺路线制备的样品进行药效对比。试验结果显示,通脉养心方新工艺提取物均具有降低氯仿诱发小鼠室颤发生率及抑制去甲肾上腺素造成的离体大鼠胸主动脉血管收缩的药理作用,相同剂量下,工艺二药理作用优于工艺一。

以甘草酸含量为考察指标,使用正交试验优化醇提工艺参数,包括乙醇体积分数、提取时间、溶

剂用量,确定最优提取工艺为:60%乙醇提取2次,第一次8倍量提取1.5h,第二次6倍量提取1h。

采用上述药理模型对通脉养心方最佳提取工艺样品进行验证。试验结果表明,工艺优化后的通脉养心方具有良好的降低实验性心律失常及舒张大鼠离体胸主动脉的活性,呈现量-效关系。通脉养心方在心血管方面药理作用的评价及作用机制的考察,还有待进一步的研究和探讨。

参考文献

- [1] 中国药典[S]. 一部. 2010.
- [2] 徐叔云. 药理实验方法学 [M]. 第4版. 北京: 人民卫生出版社, 2010.
- [3] 陈 奇. 中药药理研究 [M]. 第2版. 北京: 人民卫生出版社, 2006.
- [4] 蔡小军, 王 怡, 胡利民, 等. 通脉养心口服液对实验性心律失常的保护作用 [J]. 世界中医药, 2010, 5(6): 425.
- [5] 冯 蓓, 张三印. 参附注射液对离体大鼠胸主动脉血管环的实验研究 [J]. 中药药理与临床, 2010, 26(5): 17-19.
- [6] 赵树仪, 陈卫平, 祝君梅, 等. 通脉养心口服液与通脉养心丸药理作用比较 [J]. 中草药, 1994, 25(6): 308.