

川归藿香颗粒挥发油提取工艺优选及药效学分析

孟超¹, 杨建龙², 王海洋¹, 李芳彤¹, 王康宇¹, 李剑男^{1*}

(1. 长春中医药大学, 长春 130117; 2. 长春市食品药品检验所, 长春 130112)

[摘要] **目的:** 优选川归藿香颗粒中挥发油的提取工艺, 并考察该制剂的药效。**方法:** 以挥发油提取率为评价指标, 采用正交试验考察萃取时间、压力、温度对川归藿香颗粒中挥发油提取工艺的影响, 通过热板镇痛试验、扭体试验和耳肿胀试验考察颗粒剂的消炎镇痛作用。**结果:** 最佳提取工艺条件为萃取压力 25 MPa, 萃取温度 50 °C, 萃取时间 1.5 h; 挥发油提取率 38.3 mg·g⁻¹。按新、旧工艺制备的川归藿香颗粒具有镇痛、抗炎作用, 且前者的药效强于后者。**结论:** 优选的提取工艺设计合理、稳定可行, 适合于工业化生产, 制备的川归藿香颗粒能延长小鼠痛阈值, 减少小鼠扭体次数, 抑制小鼠耳肿胀度。

[关键词] 萃取法; 挥发油; 川归藿香颗粒; 热板镇痛试验; 扭体试验

[中图分类号] R283.6; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)02-0021-03

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016020021

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20151210.1442.016.html>

[网络出版时间] 2015-12-10 14:42

Optimization of Extraction Technology of Volatile Oil in Chuangui Huoxiang Granules and Its Pharmacodynamics Analysis

MENG Chao¹, YANG Jian-long², WANG Hai-yang¹, LI Fang-tong¹, WANG Kang-yu¹, LI Jian-nan^{1*}

(1. Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China;

2. Changchun Institute for Food and Drug Control, Changchun 130112, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize extraction technology of volatile oil in Chuangui Huoxiang granules and investigate its pharmacodynamics. **Method:** Taking yield of volatile oil as index, orthogonal test was adopted to optimize extraction technology of volatile components with extraction time, pressure and temperature as factors. Analgesic and anti-inflammatory effects of this granules was studied by hot plate analgesia experiment, writhing test and ear swelling experiment. **Result:** Optimum extraction conditions were as follows: extraction pressure of 25 MPa, temperature at 50 °C and lasting for 1.5 h; yield of volatile oil was 3.83 mg·g⁻¹. Chuangui Huoxiang granules had analgesic and anti-inflammatory effects which prepared by the new process or the old process, and efficacy of the former was stronger than the latter. **Conclusion:** This optimized extraction process is reasonable, stable and suitable for industrial production of Chuangui Huoxiang granules, this granules can prolong pain threshold of mice, decrease writhing response of mice and inhibit ear swelling degree in mice.

[Key words] Supercritical CO₂ extraction method; volatile oil; Chuangui Huoxiang granules; hot plate analgesia test; writhing test

川归藿香颗粒为临床经验方, 由川芎、当归、广藿香、三七等 10 味药材组成, 具有活血化瘀、行气通络、消炎止痛之功效, 主要用于气滞血瘀、跌打损伤、

炎症引起的疼痛, 疗效良好。原制剂工艺是将药材煎煮后干燥, 加入适当辅料制成颗粒剂服用。现代药学研究表明川芎、当归、藿香含有的挥发油具有止

[收稿日期] 20150527(013)

[基金项目] 吉林省科技发展计划项目(20120935)

[第一作者] 孟超, 实验员, 从事生物科学研究, Tel:18604306414, E-mail:115595308@qq.com

[通讯作者] * 李剑男, 博士, 助教, 从事中药活性物质分离与鉴定研究, Tel:18210978335, E-mail:331653429@qq.com

痛效果,但在煎煮过程中这些成分损失很大^[1-3]。为尽量保留药材中活性成分,使制剂起到联合起效的作用,本实验运用超临界 CO₂ 萃取技术提取处方中川芎、当归、广藿香 3 味药材的挥发油,制成包合物,将药渣与其余药材混合后煎煮,干燥成浸膏,加入包合物及适量辅料混合,制成颗粒剂,并对制得的颗粒剂进行药效学验证,为该方申报院内制剂或新药提供参考。

1 材料

BP211D 型电子分析天平(上海天平仪器厂), HA121-50-02 型超临界萃取仪(南通市华安超临界萃取公司), YLS-6A 型智能热板仪(山东省医学科学院设备站)。川芎、当归、广藿香、三七、石菖蒲等药材(均购于河南聚仁中药饮片公司,经长春中医药大学大学生药学实验室姜大成教授鉴定,均符合 2010 年版《中国药典》相关项下要求),β-环糊精(惠世生化试剂有限公司),试剂均为分析纯。

昆明种小鼠,体重(20 ± 2) g,动物及其饲料均购于吉林大学白求恩医学院实验动物中心,合格证号 SCXK(吉)2014-0002。

2 方法与结果

2.1 挥发油的提取 选择萃取压力、萃取温度、萃取时间为考察因素^[4],采用 L₉(3⁴) 正交试验,以挥发油得率为评价指标,称取干燥川芎、当归、藿香 3 味药材,粉碎成粗粉(过 40 目筛),每次进料 320 g,共 9 份,分别置于 1 L 萃取釜中,按设定条件,调节萃取温度、萃取压力和萃取时间,待压力、温度均达设定条件后开始萃取。试验安排及结果见表 1,方差分析见表 2。直观分析表明各影响因素的主次关系依次为 A > B > C。方差分析表明因素 A, B 具有显著性影响,因素 C 影响不显著,确定最佳工艺条件为 A₂B₃C₂,即萃取压力 25 MPa,萃取温度 50 ℃,萃取时间 1.5 h。按处方比例称取川芎、当归、藿香 3 味药材,共 3 份,每份 960 g,按最佳工艺参数提取挥发油,结果挥发油提取率分别为 39.2, 37.5, 38.2 mg·g⁻¹,证明优选的工艺参数稳定可行。

2.2 川归藿香颗粒的制备 取提取的挥发油,加入一定体积水和适量 β-环糊精,共同加入胶体磨中,调整相应工艺参数,制备成包合物,待用;取提取挥发性成分后的药渣,与处方中其他药材混合,按原提取工艺提取(将药材煎煮 2 次,提取时间分别为 2.0, 1.0 h),滤过,干燥至相对密度 1.25 ~ 1.35(60 ℃),在稠膏中加入包合物(含油率 88%)及其他辅料,混合均匀,制软材,制粒,60 ℃ 下干燥,即得。

表 1 川归藿香颗粒中挥发油提取工艺正交试验分析

Table 1 Orthogonal test analysis of extraction process of volatile oil from Chuangui Huoxiang granules

No.	A 萃取压力 /MPa	B 萃取温度 /℃	C 萃取时间 /h	挥发油萃取率 /g·g ⁻¹
1	20	40	1.0	0.021 5
2	20	45	1.5	0.029 0
3	20	50	2.0	0.031 1
4	25	40	1.5	0.033 4
5	25	45	2.0	0.035 8
6	25	50	1.0	0.038 1
7	30	40	2.0	0.030 9
8	30	45	1.0	0.032 9
9	30	50	1.5	0.036 5

表 2 挥发油萃取率方差分析

Table 2 Variance analysis of yield of volatile oil

因素	SS	MS	F	P
A	1.177	0.589	34.618	<0.05
B	0.668	0.334	19.647	<0.05
C	0.078	0.039	2.294	>0.05
D(误差)	0.030	0.015		

注: F_{0.05}(2, 2) = 19。

2.3 药效学研究

2.3.1 对小鼠热板痛阈的影响 于室温下将每只雌性小鼠放在热板上[温度(55 ± 0.5) ℃],观察并记录小鼠被放在热板上到出现舔后足的时间, < 5 s 或 > 30 s 或跳跃者弃之不用。取满足要求的小鼠,共 60 只,随机等分为 5 组,分别为模型组、阳性组(给药量 25 g·kg⁻¹)和川归藿香颗粒高、中、低剂量组(给药量分别为 50, 25, 12.5 g·kg⁻¹),测定正常痛阈值(即用药前痛阈值)^[5]。阳性组给以原工艺制备的川归藿香颗粒混悬液,各给药组分别给以不同浓度新工艺制备的川归藿香颗粒混悬液,模型组给以相应体积水,灌胃给药,每日 1 次,连续 3 d,分别于给药后 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 h 测定小鼠痛阈值。如 60 s 仍无反应,其痛阈值以 60 s 计算^[6],为避免烫伤,将小鼠取出,见表 3。结果表明按新、旧工艺制备的川归藿香颗粒均具有镇痛效果,且在给药 1.5 h 后,在给药剂量相同的情况下,前者药效显著优于后者。

2.3.2 对乙酸致小鼠扭体的影响 取雌性小鼠 50 只,随机等分为 5 组,按 2.3.1 项下方法给药,末次给药后 1 h,分别腹腔注射 0.6% 乙酸溶液 0.2 mL,观察注射后 15 min 内的扭体反应(腹部收缩内凹、伸展后肢、臀部抬高、爬行)次数^[6-7],按(模型组扭体数 - 药物组扭体数)/模型组扭体数 × 100%^[3]计算扭体反应抑制率,见表 4。结果表明按新、旧

表 3 川归藿香颗粒的小鼠热板镇痛试验痛阈值($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 3 Hot plate analgesia test in mice of Chuangui Huoxiang granules ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	给药量/g·kg ⁻¹	0.5 h	1.0 h	1.5 h	2.0 h
模型	-	12.05 ± 3.999	13.62 ± 2.122	12.21 ± 2.183	14.02 ± 3.321
阳性	25	16.38 ± 2.993 ¹⁾	18.91 ± 4.462 ¹⁾	19.38 ± 5.001 ¹⁾	20.03 ± 2.858 ¹⁾
川归藿香颗粒	50	21.46 ± 4.312 ^{2,3)}	21.51 ± 3.799 ^{2,3)}	24.51 ± 5.030 ^{2,3)}	27.08 ± 3.313 ^{2,4)}
	25	17.10 ± 3.111 ¹⁾	20.18 ± 3.128 ²⁾	23.01 ± 3.972 ^{2,4)}	26.18 ± 5.138 ^{2,4)}
	12.5	14.98 ± 3.010	20.21 ± 2.257 ²⁾	18.23 ± 1.997 ¹⁾	21.36 ± 5.550 ¹⁾

注:与模型组比较¹⁾P < 0.05, ²⁾P < 0.01; 与阳性组比较³⁾P < 0.05, ⁴⁾P < 0.01(表 4 同)。

表 4 川归藿香颗粒的小鼠扭体和耳肿胀试验($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 4 Writhing and ear swelling test in mice of Chuangui Huoxiang granules ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	给药量/g·kg ⁻¹	扭体数/次	扭体反应抑制率/%	肿胀度/g	肿胀抑制率/%
模型	-	29.81 ± 7.007	-	0.009 3 ± 0.001 12	-
阳性	25	22.09 ± 3.122 ¹⁾	25.90	0.007 1 ± 0.002 05 ¹⁾	23.65
川归藿香颗粒	50	16.89 ± 4.078 ²⁾	43.34	0.005 9 ± 0.001 09 ²⁾	36.56
	25	19.21 ± 3.987 ¹⁾	35.56	0.006 2 ± 0.001 38 ²⁾	33.33
	12.5	22.00 ± 4.356 ¹⁾	26.20	0.006 7 ± 0.001 01 ¹⁾	27.96

工艺制备的川归藿香颗粒均具有显著的镇痛作用,在给药量相同的情况下,前者药效呈现强于后者的趋势。

2.3.3 对小鼠耳廓炎症的影响 取雄性小鼠 50 只,随机等分为 5 组,按 2.3.1 项下方法给药,于末次给药后 1 h,用二甲苯涂于小鼠右耳廓两面(0.02 mL/只),0.5 h 后将小鼠颈椎脱臼致死,沿耳廓基线剪下两耳,用 6 mm 的打孔器分别在同一部位打下圆耳片,精密称定^[8],按肿胀度 = 左耳片质量 - 右耳片质量和(模型组耳肿率 - 给药组耳肿率)/模型组耳肿率 × 100% 计算,见表 4。结果显示模型组小鼠右耳明显红肿,厚度增加,两耳片差异较大,与模型组比较,各给药组均有显著性改善,表明按新、旧工艺制备的川归藿香颗粒均具有抗炎作用。

3 讨论

挥发油常用的提取技术有水蒸气蒸馏、挤压法、超临界 CO₂ 萃取法等,其中超临界 CO₂ 萃取法具有萃取温度低、时间短、可最大限度保持挥发性成分稳定性等优点,对热不稳定及易氧化成分有良好的提取效果,适合大工业生产^[9-10]。传统颗粒剂制备工艺中,一般是将挥发性成分喷洒在物料中制颗粒,或者直接喷在颗粒上,这种制备方法往往具有有效期短的缺陷,同时对包装材料有一定要求。为此,本文将挥发性成分用 β-环糊精包合,使液体固化,增加了挥发性成分的稳定性,同时 β-环糊精本身也是固体制剂的一种常用辅料,无毒无刺激性,有益于颗粒成型性。药效学研究结果表明按新、旧工艺制备的

川归藿香颗粒具有镇痛、抗炎作用,且前者的药效强于后者。

[参考文献]

[1] 尹辉. 当归化学成分及药理活性研究进展[J]. 重庆科技学院学报, 2015, 17(1): 100-112.

[2] 穆启运, 蓝涛华, 徐方方, 等. 正交试验优选川芎和细辛挥发油的 β-环糊精微囊萃取工艺及成分分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(20): 1-5.

[3] 林彦君, 许莉, 陈佳江, 等. 川藿香与广藿香挥发油化学成分 GC-MS 对比分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(20): 100-102.

[4] 曹明宇. 中药挥发油绿色提取技术的研究[D]. 石家庄: 河北科技大学, 2011.

[5] 黄民, 张春晓, 刘永峰, 等. 可卡因对大鼠痛阈和缰核痛相关神经元放电的影响[J]. 中国应用生理学杂志, 2006, 22(2): 172-173.

[6] 陈小野, 张宇鹏, 蒋小丽, 等. 热板法、醋酸扭体法疼痛模型寒、热属性的初步研究[J]. 浙江中医学院学报, 2005, 29(4): 46-52.

[7] 刘和莉, 李月玲, 薛永志. 不同温度和醋酸浓度对小鼠扭体疼痛模型的影响[J]. 包头医学院学报, 2006, 22(2): 137-138.

[8] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 882-883.

[9] 柏立浩, 张丽. 超临界流体萃取技术在中药研究中的应用与发展[J]. 西部中医药, 2013, 26(2): 114-118.

[10] 吕志祥. 关于中药提取新技术的研究进展[J]. 求医问药, 2013, 11(7): 134-135.

[责任编辑 刘德文]