

通脉口服液提取工艺变更及药理试验验证

杨凤梅¹, 熊永爱¹, 侯莉伟¹, 黄晶¹, 王念明¹, 杨明^{1,2*}

(1. 成都中医药大学, 成都 611137;

2. 江西中医学院中药现代制剂教育部重点实验室, 南昌 330004)

[摘要] **目的:**比较不同提取工艺制备的通脉提取液对实验性小鼠心肌缺血的影响。**方法:**采用腹腔注射异丙肾上腺素建立小鼠心肌缺血模型,比较不同提取工艺制备的通脉提取液 A 和通脉提取液 B、市售通脉口服液、复方丹参片不同药物对小鼠血浆 ATP 含量、心肌组织的影响。**结果:**模型对照组、通脉口服液组、通脉提取液 A 组、通脉提取液 B 组、复方丹参片组、空白正常组血浆中 ATP 质量浓度分别为(197.06 ± 77.78), (239.60 ± 60.90), (328.21 ± 84.27), (318.42 ± 70.87), (271.13 ± 66.45), (475.93 ± 94.98) μg·L⁻¹,心肌组织损伤指数分别为(2.26 ± 0.86), (1.16 ± 0.28), (0.59 ± 0.17), (0.76 ± 0.23), (0.68 ± 0.12), 0。通脉提取液 A 和通脉提取液 B 均表现出比通脉口服液更为显著的治疗效果,治疗效果优于复方丹参片,且通脉提取液 A 效果略优于通脉提取液 B。**结论:**变更工艺后制备的通脉提取液 A 和 B 均可显著改善小鼠心脏缺血,提高心功能,治疗效果明显优于市售通脉口服液,其中通脉提取液 A 作用更显著。

[关键词] 通脉口服液; 不同工艺; 心脏缺血; ATP; 心肌组织

[中图分类号] R283.6; R284.2; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)20-0032-04

[doi] 10.11653/syfy2013200032

Extraction Technology Change and Pharmacological Test Verification of Tongmai Oral Liquid

YANG Feng-mei¹, XIONG Yong-ai¹, HOU Li-wei¹, HUANG Jing¹, WANG Nian-ming¹, YANG Ming^{1,2*}

(1. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Chengdu 611137, China;

2. Key Laboratory of Modern Preparation of TCM, Ministry of Education,

Jiangxi University of TCM, Nanchang 330004, China)

[Abstract] **Objective:** To compare effects of different extraction processes for Tongmai oral liquid on experimental myocardial ischemia in mice. **Method:** Intraperitoneal injection of isoproterenol in mice to establish model of myocardial ischemia. Effects of Tongmai extract A, Tongmai extract B, commercially available Tongmai

[收稿日期] 20130410(016)

[第一作者] 杨凤梅, 硕士, 从事中药新制剂、新剂型、新技术研究, Tel:18208128471, E-mail:1040736068@qq.com

[通讯作者] * 杨明, 教授, 博士生导师, 从事中药新制剂、新剂型、新技术研究, Tel:028-61800127, E-mail:yangming16@126.com

[参考文献]

- [1] 郝丽莉, 芦彦学, 王亚威, 等. 动物胆汁的药用研究[J]. 中医药信息, 1999, 16(3):13.
- [2] 刘养清, 刘二保. 动物胆汁理化特性及药用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2002:121.
- [3] 王凯平, 石朝周. 动物胆汁药用研究的概况与展望[J]. 中国中医药科技, 2000, 7(5):350.
- [4] 张能荣. 牛羊胆汁质量的研究[J]. 中草药, 1983, 14(7):15.

- [5] 赵文静, 蒋蕾, 旺建伟. 羊胆汁与其主要成分抗炎作用的比较研究[J]. 中医药学报, 2009, 37(4):20.
- [6] 吕军, 赵松华. 牛羊胆酸精品生产工艺的改进[J]. 贵阳医学院学报, 1997, 22(3):311.
- [7] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010:7.

[责任编辑 全燕]

oral liquid and compound Danshen tablets on plasmic ATP content and myocardial tissue in mice were compared.

Result: The concentration of plasmic ATP in model group, Tongmai oral liquid group, Tongmai extract A group, Tongmai extract B group, compound Danshen tablets group and blank control group were (197.06 ± 77.78) , (239.60 ± 60.90) , (328.21 ± 84.27) , (318.42 ± 70.87) , (271.13 ± 66.45) , $(475.93 \pm 94.98) \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively; Myocardial tissue damage index of these groups were (2.26 ± 0.86) , (1.16 ± 0.28) , (0.59 ± 0.17) , (0.76 ± 0.23) , (0.68 ± 0.12) , 0, respectively. Treatment effect of Tongmai extract A and Tongmai extract B were significantly better than Tongmai oral liquid and better than compound Danshen tablets without significantly influence, but Tongmai extract A was slightly better than Tongmai extract B. **Conclusion:** After changing of extraction processes, Tongmai extract A and Tongmai extract B could significantly improve myocardial ischemia in mice by increasing heart function, treatment effect was significantly better than commercially available Tongmai oral liquid, wherein Tongmai extraction A showed more significant role.

[**Key words**] Tongmai oral liquid; different processes; cardiac ischemia; ATP; myocardial tissue

通脉口服液收载于《中华人民共和国卫生部药品标准中药成方制剂》第20册^[1],由丹参、川芎、葛根组成,主要有效成分为丹参素、阿魏酸、葛根素等水溶性成分^[2-3],具有活血通脉的功效,用于治疗缺血性心脑血管疾病、动脉硬化、脑血栓、脑缺血、冠心病、心绞痛。现代研究表明丹参治疗心脑血管疾病的物质基础为脂溶性的菲醌类成分(丹参酮Ⅱ_A、隐丹参酮等)和水溶性的酚酸类成分(丹参素、丹参酚酸B等)^[4-6]。其中丹参酮Ⅱ_A能增加冠脉血流量,改善缺氧后引起的心肌代谢紊乱,提高心肌耐缺氧的能力;丹参素具有显著扩张冠状动脉,增加冠脉血流量,降低心肌耗氧量和增加心肌收缩力的作用。川芎的主要有效成分包括以川芎嗪为代表的含氮化合物、以藁本内酯为主的苯胺类和以阿魏酸为代表的有机酸类成分,其中川芎嗪和藁本内酯易溶于乙醇等有机溶剂,而阿魏酸易溶于水。川芎嗪具有扩张冠状动脉、增加动脉血流量、松弛血管平滑肌的药理作用,阿魏酸能抑制血小板聚集、抗血栓、解除血管平滑肌痉挛、改善心肌缺血等作用^[7]。

通脉口服液的现行制备工艺存在一定的缺陷,只强调了3味药材的水溶性成分,而忽略了丹参酮Ⅱ_A、藁本内酯等脂溶性成分。本实验拟通过考察通脉口服液不同提取工艺对小鼠缺血性心脏病的药效,优化制剂工艺,提升质量标准,培育通脉中成药大品种。

1 材料

BSA224S型1/万电子天平(赛多利斯科学仪器有限公司),BIS-2113型多功能酶标仪(美国Thermo),QYC-200型恒温摇床(上海福玛仪器有限公司),TG2-16C型低温离心机(上海安亭科学仪器厂),SK12-6型电热恒温水浴锅(浙江宁波医疗器械

厂)。通脉口服液(四川科伦药业股份有限公司,批号E111208S),复方丹参片(阳性药,北京同仁堂,批号1121830),异丙肾上腺素(上海禾丰制药有限公司,批号110201),生理盐水(四川科伦药业股份有限公司),甲醛(成都市科龙化工试剂公司),Mice ATP Elisa试剂盒(上海生物工程技术有限公司)。

KM小鼠,SPF级,雌雄各半,体重18.5~22.5g,由成都达硕生物科技有限公司提供,动物合格证号SCXKC(111)2008-24。

通脉提取液A为取丹参、葛根和川芎(经成都中医药大学药学院杨明教授鉴定分别为唇形科植物丹参*Salvia miltiorrhiza* Bunge的干燥根及根茎,豆科植物甘葛藤*Pueraria thomsonii* Benth的干燥根,伞形科植物川芎*Ligusticum chuanxiong* Hort.的干燥根茎)各100g,混匀,加95%乙醇3L加热回流1h,提取液滤过,滤液回收乙醇并浓缩至适量;药渣用50%乙醇3L加热回流1h,提取液滤过,滤液回收乙醇并浓缩至适量;药渣加水3L煎煮2h,滤过,蒸干,将3种浸膏合并,备用。通脉提取液B为取丹参、川芎、葛根各100g,混匀,加60%乙醇3L回流提取3次,每次1h,提取液滤过,合并滤液,回收乙醇并浓缩成浸膏,备用。

2 方法与结果

2.1 小鼠心肌缺血模型的建立^[8-9] KM小鼠按体重随机分为6组,每组10只,分别为模型对照组(等体积纯净水)、通脉口服液组($5 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$)、通脉提取液A组($7.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)、通脉提取液B组($7.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)、复方丹参片组($3.6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)、空白正常组(等体积纯净水),每组小鼠每天灌胃1次,连续7d,从第6d开始,除空白正常组外,其余各组小鼠按3

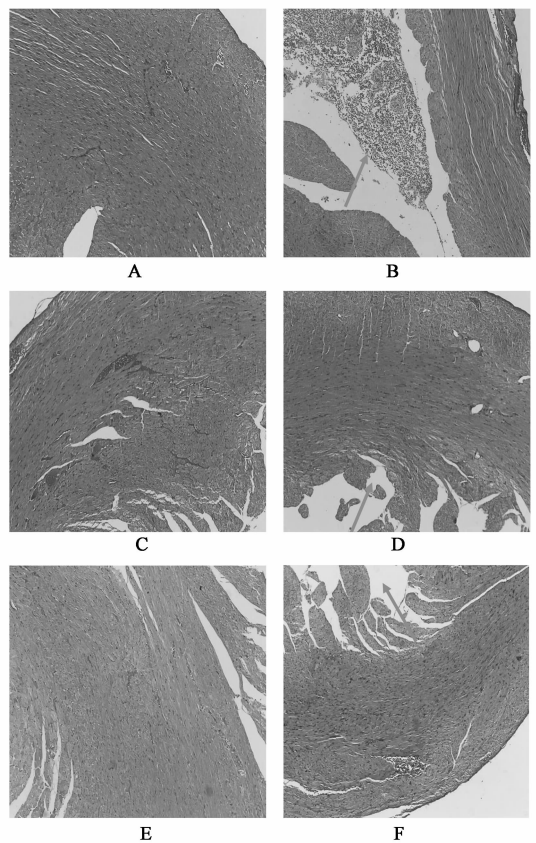
$\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量腹腔注射异丙肾上腺素,连续 2 d,空白正常组小鼠腹腔注射给予同等剂量生理盐水。采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析,组间利用单因素方差分析,方差齐者组间进行 LSD 检验,方差不齐者进行 Tamhane's T2 检验。

2.2 心肌代谢指标测定 心脏穿刺采集血液,于 $4\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min,收集上清液,利用 Elisa 法测定各组血浆中 ATP 质量浓度 ($\bar{x} \pm s, n = 10$) 分别为 (197.06 ± 77.78), (239.60 ± 60.90), (328.21 ± 84.27), (318.42 ± 70.87), (271.13 ± 66.45), (475.93 ± 94.98) $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。表明与空白正常组比较,模型对照组、复方丹参片组和通脉口服液组小鼠血浆中 ATP 含量均有不同程度降低 ($P < 0.05$);与模型组比较,提取液 A 组和提取液 B 组小鼠血浆中 ATP 含量均有显著升高 ($P < 0.05$),揭示 2 种不同工艺所得通脉提取液均能通过升高血浆中 ATP 含量降低小鼠缺血性心脏病异常, A 组效果略优于 B 组;复方丹参片组小鼠血浆中 ATP 含量显著升高 ($P < 0.05$),通脉口服液组呈升高趋势。与复方丹参片组相比,提取液 A 组和 B 组小鼠血浆中 ATP 含量均呈升高趋势;与通脉口服液比较,提取液 A 组和 B 组小鼠血浆中 ATP 含量均显著升高 ($P < 0.05$)。

2.3 心肌组织病理形态学观察 给药结束后,断颈处死各组小鼠,剖取心脏,用生理盐水洗净残留血液,以常规石蜡包埋,组织切片,HE 染色,偏光显微镜观察心肌组织病理形态,结果见图 1。

由图 1 可知,正常组小鼠心肌内膜内皮完整,心肌组织横纹清晰,核正常,无水肿,间质未见血管扩张及炎组织浸润。模型组小鼠心肌组织损伤严重,区域性变性坏死明显,心内膜内皮不完整,有多处片状坏死灶,间质内大量淋巴组织、巨噬组织弥漫性浸润,可见血管扩张充血。与模型组比较,复方丹参片组和通脉提取液 A 组小鼠心内膜内皮相对完整,但仍可见散在的组织变性坏死,间质内有程度不等的淋巴组织及巨噬组织浸润,未见明显血管扩张,提示其对心肌缺血小鼠心肌组织损伤均有一定的保护作用。通脉口服液组和通脉提取液 B 组小鼠心内膜内皮不完整,可见散在的组织变性坏死,间质内有程度不等的淋巴组织及巨噬组织浸润。

2.4 心肌组织损伤指数 将各组小鼠心肌组织显微镜观察结果进行等级评分(评分标准为无坏死性损伤或炎症 0 分;血管轻度扩张、水肿 1 分;血管扩张,组织炎性浸润,轻度坏死 2 分;严重坏死,血管严



A. 空白正常组;B. 模型对照组;C. 复方丹参片组;
D. 通脉口服液组;E. 通脉提取液 A 组;F. 通脉提取液 B 组
图 1 不同组小鼠的心肌组织病理形态(HE, $\times 200$)

重扩张,淋巴滤泡增生 3 分),作为药物治疗心肌缺血等疗效的量化指标,以心肌组织损伤指数计,结果空白正常组、模型对照组、复方丹参片组、通脉口服液组、通脉提取液 A 组、通脉提取液 B 组分别为 0, (2.26 ± 0.86), (0.68 ± 0.12), (1.16 ± 0.28), (0.59 ± 0.17), (0.76 ± 0.23)。显示与空白正常组比较,模型对照组、复方丹参片组和通脉口服液组小鼠心肌组织的损伤指数均显著增大 ($P < 0.05$);与模型组比较,提取液 A 组和提取液 B 组小鼠心肌组织的损伤指数均显著减小 ($P < 0.05$),表明 2 种不同工艺制备的通脉提取液均能明显改善小鼠心肌组织缺血性坏死,血管扩张,炎性组织浸润等病变,且 A 组效果略优于 B 组;复方丹参片组小鼠心肌组织的损伤指数显著减小 ($P < 0.05$),通脉口服液组有减小趋势。与复方丹参片组比较,提取液 A 组小鼠心肌组织的损伤指数有减小趋势;与通脉口服液比较,复方丹参片、提取液 A 组小鼠心肌组织损伤指数均显著减小 ($P < 0.05$)。

3 讨论

当心脏因长期供血绝对减少或相对不足时,心

肌毛细血管的增长滞后于心肌细胞体积的增加,氧的弥散间距增大,导致心肌过度肥大而缺氧,心肌能量 ATP 生成障碍,从而导致心肌收缩性逐渐减弱,以致最后引起心肌组织纤维化损伤、区域性变性坏死、心内膜内皮不完整、间质内大量淋巴组织、血管扩张充血等病理现象^[10-11],试验选择小鼠血浆中 ATP 含量、心肌组织病理形态、心肌组织损伤指数为指标,可直观评价不同组别小鼠的心肌缺血程度^[12-13]。

变更工艺后所制备的 2 种通脉提取液可显著治疗小鼠缺血性心脏病,治疗效果均明显优于市售通脉口服液,且通脉提取液 A 效果优于通脉提取液 B。与市售通脉口服液相比,2 种不同工艺制备的通脉提取液对小鼠缺血性心脏病的治疗效果已明显提升,一方面证实了通脉原提取工艺存在的不足,另一方面证实了变更后的工艺可显著保留通脉方中治疗缺血、缺氧性心脑血管疾病的活性物质,从药理学角度证明了工艺变更的科学合理性,通脉提取液 A 的制备工艺可行。

[参考文献]

[1] 卫生部药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准中药成方制剂. 第 20 册[M]. 北京:卫生部药典委员会,1991:302.

[2] WANG F R, YANG X W, ZHANG Y, et al. Three new isoflavone glycosides from Tongmai granules[J]. J Asian Nat Prod Res, 2011, 13(4): 319.

[3] 陈文杰. 葛根药理作用及临床应用研究进展[J]. 中国现代医药杂志, 2008, 10(12): 142.

[4] 董蕊, 郑毅男. 丹参中丹参酮成分的分离与鉴定[J]. 吉林师范大学学报:自然科学版, 2004, 5(2): 100.

[5] 赵娜, 郭治昕, 赵雪, 等. 丹参的化学成分与药理作用[J]. 国外医药:植物药分册, 2007, 22(4): 155.

[6] 浦锡娟, 徐凯琳. 丹参的药理作用研究进展[J]. 临床医学工程, 2009, 16(8): 154.

[7] 马静, 马玲. 中药川芎中有效成分及药理作用研究进展[J]. 中国民族民间医药, 2009, 18(19): 9.

[8] 杨勇, 容蓉, 陈明强, 等. 异丙肾上腺素诱导小鼠急性心肌缺血模型的方法比较[J]. 中药药理与临床, 2010, 26(5): 153.

[9] 李峰杰, 李贻奎. 心肌梗死动物模型研究进展[J]. 中国药理学通报, 2013, 29(1): 5.

[10] 杨泉涌, 薛富善, 许亚超, 等. ATP 敏感钾通道在预先应用左旋甲状腺素钠对抗未成年大鼠离体心脏缺血-再灌注损伤中的作用[J]. 实用儿科临床杂志, 2010, 25(11): 804.

[11] 易受乡, 林亚平, 严洁, 等. 电针内关对家兔心肌损伤的影响及与 SOD、ATP 等的关系[J]. 中华实用中西医杂志, 2003, 16(11): 1587.

[12] 陈晓晴, 缪明永, 肖立国, 等. 缺血性心衰心肌能量代谢变化与心功能关系的研究[J]. 中国病理生理杂志, 1999, 15(2): 158.

[13] 杨淑琴, 岳鑫, 王文志, 等. ATP 负荷 MR 心肌灌注成像对缺血性心脏病心肌血流储备的评价[J]. 吉林大学学报:医学版, 2006, 32(1): 142.

[责任编辑 仝燕]