

提取-共沸精馏耦合工艺提取挥发油制备 颈复康颗粒的活血化瘀作用

耿榕徽¹, 姜福义¹, 王春民², 杨宇杰^{1*}

(1. 承德医学院中药研究所 河北省中药研究与开发重点实验室, 河北 承德 067000;

2. 承德颈复康药业集团有限公司 河北省中药新辅料工程技术研究中心, 河北 承德 067000)

[摘要] **目的:** 研究提取-共沸精馏耦合工艺(water extraction coupling rectification, WER)提取挥发油制备颈复康颗粒对实验性体内、外血栓形成、血液黏度及脑血流量的影响, 对 WER 工艺制备的颈复康颗粒进行药理学评价。**方法:** 取 SD 大鼠 40 只, 随机分成 5 组, 每组 8 只。即颈复康颗粒高、低剂量组(12, 6 g·kg⁻¹)、WER 工艺颈复康颗粒高、低剂量组(12, 6 g·kg⁻¹)及空白对照组, 各组连续 ig 给药 7 d。大鼠体外血栓形成: 末次给药后 2 h, 自腹腔动脉取血, 置体外血栓形成仪上测量血栓长度、湿重、干重; 大鼠体内血栓形成: 末次给药后 2 h 麻醉大鼠, 分离颈总动脉, 观察记录体内血栓形成时间; 自腹腔静脉取血测定大鼠血小板聚集率、高切、中切、低切下全血黏度及血浆黏度; 取健康成年家犬 30 只, 分组及给药等同前, 观察记录用药前后家犬脑血流量(cerebral blood flow, CBF)及脑血管阻力(cerebral vascular resistance, CVR), 分析 WER 工艺与传统工艺制备的颈复康颗粒对上述各项指标的影响。**结果:** WER 工艺提取挥发油制备的颈复康颗粒高、低剂量组均可显著延缓大鼠血栓形成时间(OT 延长率为 33.34%, 18.87%), 降低大鼠体外血栓长度、湿重和干重, 降低血小板聚集率及全血黏度和血浆黏度(血小板 5 min 聚集阻抗值分别为 6.15 Ω, 7.24 Ω), 在末次给药后 30~90 min 均可增加家犬脑血流量, 且与传统工艺颈复康颗粒同剂量组比较差异有显著性。**结论:** WER 工艺提取挥发油制备的颈复康颗粒较传统工艺制备的颈复康颗粒具有更好的活血化瘀作用。

[关键词] 提取-共沸精馏耦合; 挥发油; 颈复康颗粒; 血栓; 血小板聚集; 全血黏度; 血浆黏度; 脑血流量

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)02-0239-04

Effect of Jingfukang Granule by Water Extraction Coupling Rectification for Activating Blood Circulation to Remove Blood

GENG Rong-hui¹, JIANG Fu-yi¹, WANG Chun-min², YANG Yu-jie^{1*}

(1. Institute of Chinese Materia Medica of Chengde Medical College, Key Laboratory of
Traditional Chinese Medicine (TCM) Research and Development of Hebei Province, Chengde 067000, China;

2. Chengde Jingfukang Chengde Jingfukang Pharmaceutical Group Co., Ltd, New Materials
Engineering Technology Center of TCM of Hebei Province, Chengde 067000, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of Jingfukang granule by water extraction coupling rectification (WER) on thrombosis, blood viscosity, cerebral blood flow (CBF) and cerebral vascular resistance (CVR). **Method:** The vitro thrombus was induced and the length, wet and dry weight of the thrombus were measured. Thrombosis instrument was to observe the *invivo* occlusion time (OT). At the same time, the platelet aggregation rate, the high-, middle-, low-shear blood viscosity as well as the plasma viscosity in rats was determined. The CBF and CVR were measured before and after drugs in dogs. **Result:** Compared to Jingfukang granule, Jingfukang granule by WER could delay the OT, decrease the length, wet and dry weight of *invitro* thrombus and the platelet aggregation rate, reduce the blood viscosity, increase CBF. **Conclusion:** Jingfukang granule by WER has obvious actions of activating blood circulation to remove blood.

[Key words] WER; volatile oil; Jingfukang granule; thrombus; platelet aggregation; whole blood viscosity; plasma viscosity; cerebral blood flow

[收稿日期] 20120721(005)

[通讯作者] * 杨宇杰, 教授, 医学硕士, 从事药理学、中药新药研究与开发, Tel: 13831477909, E-mail: yyj196912@sina.com

颈复康颗粒现收载于《中国药典》2010 年版(一部),处方由羌活、川芎、葛根、秦艽、苍术、乳香、没药、地龙、桃仁等 21 味中药组成,具有活血通络,散风止痛功能。现有研究资料表明,颈复康颗粒中川芎、羌活、苍术、乳香、没药等药材中的挥发油类成分是其主要有有效部位之一,具有止痛、抗炎、活血化瘀等药理作用^[1-4]。颈复康颗粒药典标准【制法】项规定,上述 5 味药材按处方比例混合后共同提取挥发油,经倍他环糊精包结后与其他药味提取物共同制粒^[5]。目前,颈复康颗粒在生产过程中,挥发油提取采用传统蒸馏提取法。近年来有文献报道,采用提取-共沸精馏耦合工艺提取川芎、苍术等中药材挥发油成分,可以显著提高挥发油的提取率,且与传统蒸馏法提取中药挥发油比较,两种工艺提取的中药挥发油所含成分种类和各组分含量差异不大,认为该工艺提取中药挥发油具有技术上的优势^[6-7]。我们将提取-共沸精馏耦合工艺应用于颈复康颗粒生产中挥发油成分的提取过程,挥发油提取率较原工艺提高 103%,取得了理想的效果。为此,我们采用 2 种挥发油提取工艺,制备颈复康颗粒样品,进行本实验研究,以进一步评价提取-共沸精馏耦合工艺提取中药挥发油技术在颈复康颗粒生产中应用的可行性。

1 材料

1.1 动物 清洁级昆明种小鼠,20~25 g,雌雄各半,清洁级健康成年家犬,8~10 kg,雌雄各半,天津市山川红实验动物科技有限公司提供,许可证号 SCXK(津)2009-0001;清洁级 SD 大鼠,180~220 g,雌雄各半,北京华阜康生物科技股份有限公司提供,许可证号 SCXK(京)2009-0004。

1.2 药品与试剂 WER 工艺颈复康颗粒(承德颈复康药业集团有限公司提供,批号 20120201),制备方法:按颈复康颗粒处方配料,取川芎、苍术、乳香、没药、羌活 5 味药材,破碎成粗粉,WER 法提取挥发油 6 h,提取率 13.8 mL·kg⁻¹生药,挥发油用 β -环糊精包结。其他药材水提取,水提取液与提取挥发油的药液合并浓缩,喷雾干燥,药粉与 β -环糊精包结物混合均匀制粒。

颈复康颗粒,承德颈复康药业集团有限公司提供,批号 20120202。制备方法除挥发油提取部分采用传统蒸馏法提取 6 h 外,其他与 WER 工艺颈复康颗粒制备方法相同。挥发油提取率为 6.8 mL·kg⁻¹生药。

1.3 仪器 BT87-3 型实验性体内血栓形成测定仪

(包头医学院心血管研究室),QX-200 全血血小板聚集仪(上海医大仪器厂),XSN-R1 型体外血栓形成、血小板黏附两用仪(江苏无锡县电子仪器二厂),LG-R-20 型血液黏度测定仪(北京世帝科学仪器公司),BL420 生物信号采集与处理系统(成都泰盟科技有限公司)。

2 方法

2.1 对大鼠体内血栓形成时间及血小板聚集性的影响^[8-9] SD 大鼠 40 只,雌雄各半,160~180 g,随机分成 5 组,每组 8 只。即颈复康颗粒高、低剂量组(12,6 g·kg⁻¹)、WER 工艺颈复康颗粒高、低剂量组(12,6 g·kg⁻¹)及空白对照组。各组连续 ig 给药 7 d(给药容积 20 mL·kg⁻¹,各实验组用 1% 聚氧乙烯山梨糖醇酐单油酸酯(吐温-80)稀释到相应浓度,空白对照组给予等容积 1% 吐温-80。末次给药后 2 h 麻醉大鼠,仰卧位固定,分离颈总动脉,置于实验性体内血栓形成测定仪的刺激电极和温度探头钩上。选择刺激电流 2 mA、刺激时间 5 min,记录血管堵塞时间,然后在大鼠腹腔静脉采血 0.45 mL,以 ADP 为诱导剂,测定全血血小板 5 min 聚集阻抗值。

从刺激开始至温度探头测得远端动脉血管温度骤降报警的时间称为堵塞时间(occlusion time, OT),即动脉血栓形成的时间。并计算给药组血栓形成时间延长率。

$$\text{OT 延长率} = (\text{给药组 OT} - \text{对照组 OT}) / \text{对照组 OT} \times 100\%$$

2.2 对大鼠体外血栓形成的影响^[10] 实验分组、给药剂量与方法同上。末次给药后 2 h,自腹腔静脉取血 1.8 mL,立即注入内径 4 mm 硅化的聚乙烯塑料环中,置体外血栓形成仪上进行测定(74 度角,17 r·min⁻¹,旋转 10 min)。取出血栓,用滤纸吸干后,称量湿重,测量长度,然后放入烘箱(60 °C,20 min)干燥后称重。

2.3 对大鼠血液黏度的影响^[11] 实验分组、给药剂量与方法同上。末次给药后 2 h,自腹腔静脉取血 3 mL,加入肝素化试管中(实验前每只试管加入 0.5% 肝素生理盐水 0.2 mL,100 °C 烘干备用)。取 0.8 mL 用于全血黏度测定。余血离心 3 000 r·min⁻¹离心 10 min,取上清液 0.8 mL 用于血浆黏度测定。

2.4 对家犬脑血流量及脑血管阻力的影响^[12-13] 健康成年家犬 30 只,雌雄兼用,随机分为 5 组,每组 6 只,分组及给药剂量同上。静脉注射戊巴比妥钠 30 mg·kg⁻¹麻醉,仰卧位固定于手术台上,剑突下沿

腹部中线切开,分离十二指肠,供给药。分离一侧股动脉,插管连接压力换能器测定血压。沿颈正中中线切开皮肤,做气管插管;分离颈总动脉,并向上分离颈内和颈外动脉;沿颈正中线下切,下端至第一肋上缘,分离椎动脉,结扎两侧颈内动脉及一侧椎动脉,另一侧椎动脉套上内径与其粗细相符的流量计套管,测定给药前后椎动脉血流量,以其给药前后差值来反映脑血流量(CBF)的变化。测定的血压值记录于BL-420生物信号记录系统。手术结束,待所测指标稳定后,记录给药前值,经十二指肠给药,于给药后10,20,30,45,60,75,90 min记录各观测指标。最后一次记录后处死动物,取出大脑称重,并根据脑血流量及血压计算脑血管阻力(CVR)。CVR = MBP (kPa)/CBF (mL·min⁻¹·100 g brain⁻¹)。计算各组动物给药后不同时间点脑血流量与给药前脑血流量差值的平均值(ΔF)及变化率($\Delta F\%$)。

2.5 统计方法 本文所有数据均采用SPSS 17.0软件进行统计学处理。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用独立样本 t 检验, $P < 0.05$ 为有统计意义。

表1 颈复康颗粒对大鼠体内血栓形成时间及血小板聚集的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	OT/s	OT延长率/%	血小板5 min聚集阻抗值/ Ω
空白对照	-	765.63 ± 57.44	-	13.21 ± 3.43
颈复康颗粒	12	925.00 ± 75.39 ³⁾	20.82	8.48 ± 1.74 ²⁾
	6	862.00 ± 75.05 ¹⁾	12.59	9.40 ± 1.79 ¹⁾
WER工艺颈复康颗粒	12	1 020.88 ± 82.71 ^{3,4)}	33.34	6.15 ± 1.91 ^{3,4)}
	6	910.13 ± 55.73 ³⁾	18.87	7.24 ± 1.52 ^{3,4)}

注:与对照组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$,³⁾ $P < 0.001$;与颈复康颗粒同剂量组比较⁴⁾ $P < 0.05$,⁵⁾ $P < 0.01$ (表4同)。

表2 颈复康颗粒对大鼠体外血栓形成的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	血栓长度/cm	血栓湿重/mg	血栓干重/mg
空白对照	-	2.89 ± 0.21	30.19 ± 1.29	14.51 ± 1.22
颈复康颗粒	12	2.43 ± 0.21 ¹⁾	24.85 ± 2.47 ²⁾	10.54 ± 1.49 ²⁾
	6	2.60 ± 0.16 ¹⁾	26.93 ± 1.02 ²⁾	10.79 ± 0.87 ²⁾
WER工艺颈复康颗粒	12	2.15 ± 0.22 ^{2,3)}	21.95 ± 1.52 ^{2,3)}	8.93 ± 0.48 ^{2,3)}
	6	2.39 ± 0.11 ^{2,3)}	25.26 ± 1.62 ^{2,3)}	9.88 ± 0.71 ^{2,3)}

注:与对照组比较¹⁾ $P < 0.01$,²⁾ $P < 0.001$;与颈复康颗粒同剂量组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$ (表3同)。

表3 颈复康颗粒对大鼠血液黏度的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	全血黏度/mPa·s			血浆黏度/mPa·s
		200 s ⁻¹	30 s ⁻¹	3 s ⁻¹	
空白对照	-	4.52 ± 0.10	6.04 ± 0.13	12.44 ± 0.98	1.19 ± 0.08
颈复康颗粒	12	3.94 ± 0.11 ²⁾	4.91 ± 0.19 ²⁾	8.12 ± 1.04 ²⁾	1.05 ± 0.09 ¹⁾
	6	4.17 ± 0.13 ²⁾	5.14 ± 0.10 ²⁾	10.50 ± 1.38 ¹⁾	1.09 ± 0.06 ¹⁾
WER工艺颈复康颗粒	12	3.81 ± 0.08 ^{2,3)}	4.67 ± 0.12 ^{2,4)}	6.92 ± 0.97 ^{2,3)}	0.93 ± 0.08 ^{2,3)}
	6	3.98 ± 0.15 ^{2,3)}	4.97 ± 0.18 ^{2,3)}	8.62 ± 0.94 ^{2,4)}	1.01 ± 0.07 ^{2,3)}

3 结果

3.1 对大鼠体内血栓形成时间及血小板聚集的影响 如表1所示,WER工艺制备的颈复康颗粒高、低2个剂量组均能显著延长大鼠体内血栓形成时间,并能降低血小板5 min聚集阻抗值。

3.2 对大鼠体外血栓形成的影响^[10] 如表2所示,WER工艺制备的颈复康颗粒高、低2个剂量组均能明显缩短大鼠体外血栓长度,减轻血栓湿重、干重,且与传统工艺颈复康颗粒同剂量组比较具有显著性差异。

3.3 对大鼠血液黏度的影响^[11] 如表3所示,WER工艺制备的颈复康颗粒高、低2个剂量组均可明显降低全血黏度和血浆黏度,与对照组及传统工艺颈复康颗粒同剂量组比较具有显著性差异。

3.4 对家犬脑血流量及脑血管阻力的影响^[12-13] 如表4所示,WER工艺制备的颈复康颗粒高、低2个剂量组均可显著增加家犬椎动脉血管流量,但实验中观察记录数值显示对给药后各个时间点的血管阻力均无明显影响。

表 4 颈复康颗粒对家犬脑血流量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	给药后不同时间点家犬脑血流量变化值/mL·min ⁻¹ ·100 g ⁻¹						
		10 min	20 min	30 min	45 min	60 min	75 min	90 min
空白对照	-	-3.32 ± 2.51	-1.54 ± 3.57	-1.00 ± 1.82	-4.58 ± 4.19	-5.49 ± 2.47	-4.56 ± 3.94	-2.49 ± 1.18
颈复康颗粒	12	-1.80 ± 3.10	0.08 ± 1.71	2.98 ± 1.12 ²⁾	5.28 ± 1.07 ²⁾	6.99 ± 0.95 ³⁾	5.91 ± 1.77 ³⁾	4.41 ± 1.91 ²⁾
	6	-2.85 ± 2.82	-1.04 ± 2.37	1.84 ± 0.44 ¹⁾	3.38 ± 1.32 ²⁾	5.30 ± 1.04 ³⁾	3.19 ± 1.11 ²⁾	2.21 ± 0.46 ¹⁾
WER 工艺颈	12	-1.22 ± 3.15	0.37 ± 1.01	6.59 ± 3.64 ^{2,4)}	8.42 ± 2.71 ^{3,4)}	11.00 ± 3.24 ^{3,4)}	8.57 ± 1.98 ^{3,4)}	7.29 ± 2.00 ^{3,4)}
复康颗粒	6	-1.83 ± 1.09	-0.14 ± 1.49	3.26 ± 2.54 ²⁾	5.79 ± 1.74 ^{2,4)}	7.94 ± 2.03 ^{3,4)}	5.29 ± 1.09 ^{2,5)}	3.45 ± 0.90 ^{2,4)}

4 讨论

椎动脉型颈椎病一般是由于椎动脉痉挛、管腔狭窄,造成椎基底动脉供血不足所致,临床表现以缺血性头痛、眩晕等症状为主。颈复康颗粒处方含有较多的活血化瘀中药,是该产品治疗椎动脉型颈椎病的物质基础。其中,颈复康颗粒处方中川芎、羌活、苍术、乳香、没药等药材中的挥发油类成分,具有较强的活血化瘀和抗炎镇痛作用,是主要有效部位之一,药典标准规定需要单独提取。目前,国内在中药生产过程中,挥发油提取率低是行业普遍问题,一定程度上影响了中药的治疗效果。WER 工艺提取中药挥发油技术是近年来开始研究的一种新的挥发油提取技术,可以显著提高挥发油提取率。我们将此项技术应用于颈复康颗粒生产过程中,挥发油提取率提高 103%,效果比较明显。

本实验研究结果显示:WER 工艺制备的颈复康颗粒可明显延长大鼠体内血栓形成时间;抑制大鼠体外血栓形成,降低血栓干、湿重;抑制 ADP 诱导的血小板聚集;降低全血黏度和血浆黏度。高、低 2 个剂量组在末次给药后 30~90 min,均能显著增加家犬椎动脉血管流量,其变化率与对照组比较有显著性差异,但对血管阻力无明显影响。

与传统工艺颈复康颗粒组比较,WER 工艺制备的颈复康颗粒高、低 2 个剂量组对各项药效学指标的影响与颈复康颗粒同剂量组比较均有显著性差异,提示 WER 工艺制备的颈复康颗粒具有更好的活血化瘀作用。

本研究证实了提高挥发油提取率可以相应提高颈复康颗粒活血化瘀作用的多个药效学指标,显示挥发油成分与颈复康颗粒的活血化瘀作用之间存在一定的量-效关系。

[参考文献]

- [1] 杨丽娟. 川芎的药理研究进展[J]. 黑龙江医药, 2010, 23(4): 599.
- [2] 李祖伦, 杨金蓉, 胡荣, 等. 川芎挥发油解热作用及部分机理研究[J]. 中医药信息, 2003, 20(6): 31.
- [3] 刘国生, 孙备, 明亮. 苍术挥发油与水溶性成分的主要药理作用比较[J]. 安徽医科大学学报, 2003, 38(2): 124.
- [4] 黄罗生, 顾燕飞, 李红. 中药挥发油及芳香性药物的研究进展[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(12): 1605.
- [5] 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: 1138.
- [6] 王晓影, 杨宇杰, 张立国, 等. 提取-共沸精馏耦合工艺提取川芎挥发油的研究[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(21): 2734.
- [7] 张立国, 王飞霞, 倪力军, 等. 莪术挥发油的提取工艺优化及质量分析[J]. 中药材, 2012, 35(3): 471.
- [8] 覃建民, 李增曦, 石山, 等. 实验性体内血栓形成测定仪的研制和应用[J]. 中国药理学通报, 1992, 8(3): 236.
- [9] 邹德俊, 张宏, 甘雨, 等. 冠脉通胶囊对大鼠实验性血栓的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 18(7): 229.
- [10] 周卫, 宿树兰, 刘培, 等. 蒲黄-五灵脂药对在少腹逐瘀汤活血化瘀效应中的贡献[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 17(6): 179.
- [11] 储戟农, 张早华, 刘建勋, 等. 红景天注射液对动物血小板聚集、体外血栓形成及血液黏度的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2005, 11(5): 39.
- [12] 赵丽艳, 蒲云, 赵青山, 等. 六味地黄汤加减对脑血流量及血液流变性的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(3): 222.
- [13] 刘建国, 陈海生, 徐从立, 等. 天冬总皂苷对麻醉犬脑血流量及脑血管阻力的影响[J]. 第二军医大学学报, 2008, 29(4): 431.

[责任编辑 聂淑琴]