

DOI:CNKI:11-3495/R.20110314.0940.003

化学与药效学指标相结合改进痛经宝颗粒中挥发油提取工艺

王绪颖, 陈彦*, 张振海, 王丽静, 贾晓斌

(江苏省中医药研究院中药新型给药系统重点实验室,
国家中医药管理局中药释药系统重点研究室, 南京 210028)

[摘要] **目的:**改进痛经宝颗粒中挥发油的提取工艺。**方法:**以藁本内酯、桂皮醛、木香烯内酯和去氢木香内酯的含量为化学指标改进痛经宝颗粒中当归、肉桂、木香挥发油的提取工艺,优选了挥发油超临界 CO₂ 提取的最佳条件,并采用小鼠痛经模型、大鼠子宫痉挛模型比较了工艺改进前后制剂的药效。**结果:**当归单独提取、肉桂、木香合并提取挥发油的方法都以超临界 CO₂ 萃取较佳,当归挥发油最佳萃取条件为压力 25 MPa,温度 40 ℃,萃取 2 h;肉桂、木香挥发油最佳萃取条件为压力 35 MPa,温度 55 ℃,萃取 2 h。工艺改进后制剂的解痉作用与原制剂比较明显增加。**结论:**经过挥发油的工艺改进,提高了痛经宝制剂的疗效,且超临界 CO₂ 萃取当归、肉桂、木香挥发油的工艺简便可行。

[关键词] 挥发油;提取工艺;化学指标;药效学指标;痛经宝颗粒

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)09-0015-07

Innovation on Extract Process of Volatile Oil in Tongjingbao Granules by Chemical Index and Pharmacodynamics Index

WANG Xu-ying, CHEN Yan*, ZHANG Zhen-hai, WANG Li-jing, JIA Xiao-bin

(Key Laboratory of New Drug Delivery System of Chinese Materia Medica, Jiangsu Provincial Academy of Chinese Medicine, Nanjing 210028, China)

[Abstract] **Objective:** To innovate and optimize the extract process of volatile oil in Tongjingbao granules. **Method:** Ligustilide, cinnamaldehyde, costunolide and dehydro- α -curcumene were used as chemical index and together with mice dysmenorrheal model and rat uterine spasm model, the best extract process of volatile oil in Radix Angelicae Sinensis, Cortex Cinnamomi Cassiae and Radix Aucklandiae were optimized. It was investigated by orthogonal experiment to optimize the conditions and parameters to extract essential oil. **Result:** Both the best extract process of Radix Angelicae Sinensis (single), Cortex Cinnamomi Cassiae and Radix Aucklandia (mix) were CO₂ supercritical fluid extraction, and the spasmolysis effect of innovated process had significant increase than the original preparation. The optimal extraction conditions of the essential oil from Angelica sinensis using supercritical fluid extraction were: pressure 25 MPa, temperature 40 ℃, extraction time 2 hour, and 35 MPa, 55 ℃ and 2 hour for essential oil from Cinnamomum cassia and Aucklandia lappa. **Conclusion:** The improvement of the extraction process of volatile oil enhanced the efficacy of Tongjingbao preparation, and the process was feasible and convenient.

[收稿日期] 20100708(001)

[基金项目] 江苏省公益研究和服务(BM2007701);江苏省社会发展科技支撑计划(BE2010756)

[第一作者] 王绪颖,硕士研究生,研究方向:中药复方物质基础研究,Tel:13092742558,E-mail:qin19861217@163.com

[通讯作者] *陈彦,博士,研究员,硕士生导师,研究方向:中药复方与新制剂研究,Tel:025-85608672,E-mail:yichen202@hotmail.com

[网络出版时间] 2011-03-14 09:40

[**Key words**] volatile oil; extraction process; chemical index; pharmacodynamics index; Tongjingbao granules

痛经宝颗粒是江苏省中医药研究院研制开发的治疗妇女原发性痛经病的有效制剂,由红花、当归、肉桂、三棱、莪术、丹参、五灵脂、木香等 9 味药材组成,具有温经化瘀、理气止痛之功效,用于寒凝气滞血瘀、妇女痛经、少腹冷痛、月经不调,经色暗淡等症。其疗效确切,有效率达 90% 以上。自 1994 年上市以来,受到病患者的普遍欢迎,已相继被 2000 年版、2005 年版和 2010 年版《中国药典》(一部)收载,被列为国家名优中成药产品。

但原制剂是在汤剂基础上的早期开发,随着科学技术的进步,有必要对其制剂的制备工艺、质量控制技术水平进一步研究,以保证和提高其临床疗效。如原制剂未对方中当归的挥发油进行提取,对肉桂、木香挥发油用水蒸气蒸馏法提取,而实际生产上用水蒸气蒸馏法提取挥发油,挥发油得率较低。文献报道当归、肉桂、木香挥发油具有很好的药理活性,是痛经宝原方发挥祛痛、舒经活血等功用的重要成份^[1-5],因此有必要对这几类挥发油的提取进行深入研究。

本文对痛经宝颗粒中的挥发油提取工艺进行改进,增加了当归挥发油的提取,并分别以当归挥发油中的活性成分藁本内酯、肉桂挥发油中的活性成分桂皮醛、木香挥发油中的活性成分木香烯内酯和去氢木香内酯的含量为指标,比较了水蒸气蒸馏法和超临界 CO₂ 萃取法 2 种工艺,并采用小鼠痛经模型、大鼠子宫痉挛模型比较了优选出的挥发油提取工艺与原工艺的药效差异,以改进和优化痛经宝制剂的制备工艺,从而进一步提升其科技含量,更好地发挥其临床疗效。

1 材料

HA221-40(50)-25 型超临界萃取装置(江苏南通华安超临界萃取有限公司),Agilent 1200 高效液相色谱仪,包括:四元梯度泵、自动进样器、恒温柱温箱、DAD 检测器,1/100 万电子天平(METTLER TOLEOR 公司),DJ-04B 型万能粉碎机(上海淀久中药机械制造有限公司),MP-100 多道生理信号分析系统(美国),Tis 3209 型在体肌肉标本系统(美国)。

红花(批号 20070611)购于安徽井泉集团中药饮片有限公司,当归(批号 20070611)、肉桂(批号

070706)、木香(批号 070308)、醋延胡索(批号 20070611)、醋三棱(批号 060717)、炒莪术(批号 060606)、丹参(批号 20070611)、五灵脂(批号 20070511),均购于南京药业股份有限公司中药饮片厂,以上药材经江苏省食品药品检验所主任医师胡浩彬鉴定为正品;藁本内酯对照品(上海同田生物科技有限公司,纯度 ≥ 98%);桂皮醛对照品(批号 110710-200212)、木香烯内酯对照品(批号 111524-200503)、去氢木香内酯对照品(批号 111525-200505)均购自中国药品生物制品检定所,阿司匹林肠溶片(批号 070642,南京白敬宇制药有限责任公司),己烯雌酚肠溶片(批号 20070521,合肥久联制药有限公司),缩宫素注射液(批号 071116,上海禾丰制药有限公司),甲醇为色谱纯(美国 TEDIA 公司),水为超纯水。

KM 种小鼠,清洁级,体重 18 ~ 20 g;SD 种大鼠,清洁级,体重 180 ~ 200 g,均购于上海斯莱克实验动物有限责任公司(原中科院上海实验动物中心),合格号 SCXK(沪)2002-0010。

2 方法与结果

2.1 以化学成分为指标比较不同挥发油的提取工艺

2.1.1 挥发油的提取 方中当归补血活血,善止血虚血瘀之痛,其活性成分除当归挥发油外还有当归酚酸和当归多糖,因此设计将当归单独提取挥发油,以便药渣再提取当归酚酸和多糖,以充分利用当归的有效成分。方中肉桂、木香作为药对应用广泛,因此设计合并提取挥发油。

水蒸气蒸馏法提取挥发油:取当归粗粉(40 目)200 g,加 6 倍量水于挥发油提取器中提取 5h,收集挥发油,测定挥发油得率和藁本内酯的含量。

取肉桂、木香粗粉(40 目)各 100 g,加 6 倍量水于挥发油提取器中提取 5h。收集挥发油,测定挥发油得率和桂皮醛、木香烯内酯和去氢木香内酯的含量。

超临界 CO₂ 萃取法提取挥发油:取当归粗粉(40 目)200 g 装入萃取釜中,用超临界 CO₂ 法萃取,萃取条件为:萃取压力为 25 MPa,萃取温度为 40 ℃,萃取时间为 3 h,收集挥发油,测定挥发油得率和

藁本内酯的含量。

取肉桂、木香粗粉(40目)各100g,装入萃取釜中,用超临界CO₂法萃取,压力35MPa,温度55℃,萃取时间为2h,收集挥发油,测定挥发油得率和桂皮醛、木香烯内酯及去氢木香内酯的含量。

挥发油得率 = 挥发油的质量 / 药材质量 × 100%

2.1.2 当归挥发油中藁本内酯的HPLC含量测定

色谱条件:Agilent HC-C₁₈柱(4.6mm×150mm,5μm),流动相甲醇-水(63:37),流速1.0mL·min⁻¹,检测波长326nm,柱温30℃。色谱图见图1。

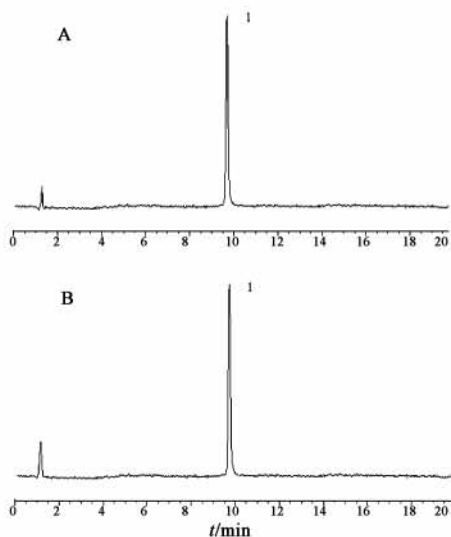


图1 当归挥发油中藁本内酯的HPLC

A. 对照品;B. 当归超临界萃取物;1. 藁本内酯

标准曲线的绘制:精密称取藁本内酯对照品1.850mg至10mL量瓶中,用甲醇定容至刻度,即得每1mL含藁本内酯0.185mg的对照品溶液。分别吸取5,10,15,20,25,30μL,按上述色谱条件分别进样分析,测得峰面积积分值。以对照品溶液的进样量为横坐标(X),峰面积积分值为纵坐标(Y),绘制标准曲线,得回归方程 $Y = 58.342X - 55.553$ ($r = 0.9999$),线性范围为0.925~5.55μg。

样品的含量测定:取当归挥发油5mg,精密称定,置于25mL量瓶中,加入甲醇溶解定容,摇匀,经0.45μm微孔滤膜滤过,取续滤液,进样20μL,按上述色谱条件进行分析,计算藁本内酯的含量。结果见表1。

2.1.3 肉桂、木香挥发油中桂皮醛、木香烯内酯和去氢木香内酯的HPLC含量测定 色谱条件:Agilent HC-C₁₈柱(4.6mm×150mm,5μm),流动相乙腈-水梯度洗脱,0~13min,乙腈37%;13~15

表1 当归挥发油提取方法比较($\bar{x} \pm s, n=3$)

提取方法	藁本内酯含量 /mg·g ⁻¹	挥发油得率 /%
水蒸气蒸馏法	1.12 ± 0.03	0.22 ± 0.05
超临界CO ₂ 萃取法	5.32 ± 0.14	1.37 ± 0.08

min,乙腈37%~63%;15~30min,乙腈63%,流速1.0mL·min⁻¹,检测波长210nm,柱温30℃。色谱图见图2。

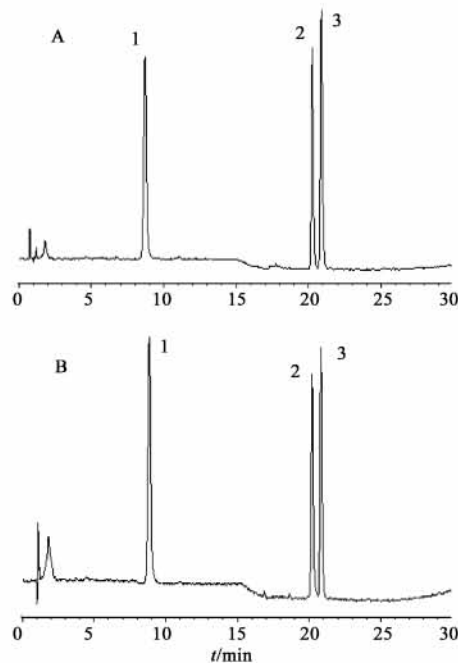


图2 肉桂、木香挥发油中桂皮醛、木香烯内酯和去氢木香内酯的HPLC

A. 混合对照品;B. 肉桂、木香超临界萃取物;
1. 桂皮醛;2. 木香烯内酯;3. 去氢木香内酯

标准曲线的绘制:分别精密称取桂皮醛对照品2.475mg、木香烯内酯对照品1.157mg和去氢木香内酯对照品1.172mg,加甲醇溶解定容至50mL,配制成每1mL中含有桂皮醛49.5μg、木香烯内酯23.14μg和去氢木香内酯23.44μg的混合对照品储备液,精密吸取混合对照品储备液3,5,10,15,20,25,30,35μL,按上述色谱条件分别进样分析,测得峰面积积分值。以对照品溶液的进样量为横坐标(X),峰面积积分值为纵坐标(Y),绘制标准曲线。桂皮醛回归方程: $Y = 115.81X + 26.598$ ($r = 0.9993$),线性范围148.5~1732.5ng;木香烯内酯回归方程: $Y = 56.009X - 9.6755$ ($r = 0.9993$),线性范围69.42~809.9ng;去氢木香内酯回归方程: $Y = 72.374X + 9.0351$ ($r = 0.9999$),线性范围

70.32 ~ 820.4 ng。

样品的含量测定:取肉桂、木香挥发油 5 mg,精密称定,置于 25 mL 量瓶中,加入甲醇溶解定容,摇

匀,过 0.45 μm 微孔滤膜,取续滤液,进样 20 μL,按上述色谱条件进行分析,计算桂皮醛、木香烃内酯、去氢木香内酯的含量。结果见表 2。

表 2 肉桂、木香挥发油提取方法比较($\bar{x} \pm s, n=3$)

提取方法	桂皮醛含量 /mg·g ⁻¹	木香烃内酯含量 /mg·g ⁻¹	去氢木香内酯 含量/mg·g ⁻¹	挥发油得率 /%
水蒸气蒸馏	6.81 ± 0.09	0.09 ± 0.01	1.15 ± 0.06	0.81 ± 0.04
超临界 CO ₂ 萃取	20.48 ± 0.37	12.86 ± 0.24	13.50 ± 0.26	4.65 ± 0.15

由表 1,2 结果可知水蒸气蒸馏法和超临界 CO₂ 萃取法提取当归、肉桂和木香挥发油,其活性成分的含量和挥发油的得率差异较大,超临界 CO₂ 萃取法所提挥发油活性成分含量高且得油率高,明显优于水蒸气蒸馏法,因此痛经宝颗粒中挥发油的提取工艺改进为用超临界 CO₂ 萃取法提取。

2.2 超临界 CO₂ 萃取法提取挥发油工艺优选 经过化学指标评价挥发油提取工艺结果可得,超临界提取法优于水蒸气蒸馏提取法,因此分别筛选了超临界 CO₂ 萃取当归、以及肉桂和木香挥发油的最佳条件。当归挥发油的提取以藁本内酯、得油率为考察指标;肉桂、木香挥发油的提取以桂皮醛、木香烃内酯和去氢木香内酯的含量及得油率为考察指标,设计正交试验对影响挥发油萃取的主要因素:萃取压力、萃取温度、萃取时间进行优选,因素水平表及结果见表 3~7。

表 3 超临界 CO₂ 萃取当归挥发油正交试验因素水平

水平	A	B	C
	萃取压力/MPa	萃取温度/℃	萃取时间/h
1	20	30	1
2	25	40	2
3	30	50	3

由表 4,通过极差分析可知,以藁本内酯含量和得油率为考察指标,超临界 CO₂ 萃取的最佳工艺条件均为 A₂B₂C₂,方差分析表明,萃取压力对藁本内酯含量影响显著(P < 0.05),因此选择超临界 CO₂ 萃取当归挥发油的最佳萃条件为:萃取压力为 25 MPa,萃取温度为 40 ℃,萃取时间为 2 h。

由表 6~7 可知,以桂皮醛含量为考察指标的最佳萃取条件为 A₃B₃C₂,以木香烃内酯含量为指标的最佳萃取条件为 A₂B₃C₃,以去氢木香内酯含量为指标的最佳萃取条件为 A₁B₃C₃,以得率为指标的最佳

表 4 超临界 CO₂ 萃取当归挥发油正交试验结果

No.	A	B	C	D	藁本内酯 /mg·g ⁻¹	挥发油 得率/%
1	1	1	1	1	4.46	0.93
2	1	2	2	2	4.79	1.12
3	1	3	3	3	4.41	0.98
4	2	1	2	3	5.32	1.09
5	2	2	3	1	5.23	1.37
6	2	3	1	2	5.27	1.14
7	3	1	3	2	4.71	0.96
8	3	2	1	3	4.96	0.86
9	3	3	2	1	4.62	1.15
藁 K ₁	4.553	4.830	4.897	4.770		
本 K ₂	5.273	4.993	4.910	4.923		
内酯 K ₃	4.763	4.767	4.783	4.897		
R×3	0.720	0.226	0.127	0.153		
得 K ₁	1.010	0.993	0.977	1.150		
油 K ₂	1.200	1.117	1.120	1.073		
率 K ₃	0.990	1.090	1.103	0.977		
R×3	0.210	0.124	0.143	0.173		

表 5 超临界 CO₂ 萃取肉桂、木香挥发油正交试验因素水平($\bar{x} \pm s, n=12$)

水平	A	B	C
	萃取压力/MPa	萃取温度/℃	萃取时间/h
1	15	35	1
2	25	45	2
3	35	55	3

萃取条件为 A₃B₃C₂。方差分析结果表明,仅温度对得率有显著性影响(P < 0.05),其他因素对各指标均无显著性影响,综合现实生产条件,选择 A₃B₃C₂,即超临界 CO₂ 萃取肉桂和木香挥发油的最佳条件为萃取压力为 35 MPa,萃取温度为 55 ℃,萃取时间为 2 h。

表6 超临界 CO₂ 萃取肉桂、木香挥发油正交试验结果

No.	桂皮醛 /mg·g ⁻¹	木香烃 内酯含量 /mg·g ⁻¹	去氢木香 内酯含量 /mg·g ⁻¹	挥发油 得率/%
1	13.60	10.52	10.32	2.73
2	13.64	12.08	12.20	2.87
3	19.46	12.86	13.50	3.79
4	15.2	12.28	10.84	3.18
5	15.74	12.24	12.48	3.14
6	16.34	12.57	12.20	3.84
7	14.08	12.08	13.36	3.12
8	18.48	9.08	8.80	3.28
9	20.48	11.88	12.70	4.65

表7 直观分析

No.	桂皮醛 /mg·g ⁻¹	木香烃内酯 /mg·g ⁻¹	去氢木香内酯 /mg·g ⁻¹	得率 /%
\bar{A}_1	15.567	11.820	12.007	3.130
\bar{A}_2	15.760	12.363	11.840	3.387
\bar{A}_3	17.680	11.013	11.620	3.683
R_A	2.113	1.350	0.387	0.553
\bar{B}_1	14.293	11.627	11.507	3.010
\bar{B}_2	15.953	11.133	11.160	3.097
\bar{B}_3	18.760	12.437	12.800	4.093
R_B	4.467	1.304	1.640	1.083
\bar{C}_1	16.140	10.723	10.440	3.283
\bar{C}_2	16.440	12.080	11.913	3.567
\bar{C}_3	16.427	12.393	13.113	3.350
R_C	0.300	1.670	2.673	0.284
\bar{D}_1	16.607	11.547	11.833	3.507
\bar{D}_2	14.687	12.243	12.587	3.277
\bar{D}_3	17.713	11.407	11.047	3.417
R_D	3.026	0.836	1.540	0.230

2.3 超临界 CO₂ 萃取法提取挥发油工艺与痛经宝颗粒原工艺的药效比较

2.3.1 药物制备 超临界 CO₂ 萃取法工艺组(SFE组):当归用超临界 CO₂ 萃取挥发油,收集挥发油,药渣加10倍量水煎煮2次,每次1h,滤过,得浓缩液。肉桂、木香用超临界 CO₂ 萃取挥发油,收集挥发油,药渣加10倍量水煎煮2次,每次1h,滤过,得浓缩液。其余药物提取方法同《中国药典》2010年版一部“痛经宝颗粒”项下制法^[6],合并各浓缩液与挥

发油混匀得 SFE 组药物。

痛经宝颗粒原工艺组(TJB组):取处方中药材,按《中国药典》2010年版一部痛经宝颗粒制法项下,制备痛经宝颗粒。

2.3.2 各药物组对己烯雌酚和缩宫素所致大鼠离体子宫痉挛的影响 取清洁级雌性大鼠50只,随机分成5组,每组10只。分别为模型组[缩宫素(OXY)],TJB高、低剂量组,SFE高、低剂量组,低剂量组生药量分别为高剂量的1/4。

取试验前2d已灌胃己烯雌酚1mg·kg⁻¹的大鼠,颈椎脱臼法处死后,迅速剖腹取出子宫,立即置于冰浴的DeJalon's溶液的玻璃平皿中,轻柔剥离附着于子宫壁上的结缔组织和脂肪组织,取一侧子宫角,两端分别用线结扎,将一端固定于充满营养液的恒温浴槽中的支架上,另一端用缝合线固定在张力传感器上,标本负荷1g,通过连接生物电放大器将子宫平滑肌的张力变化转换为电信号,由MP-100多道生理记录仪记录下来。仪器工作温度保持在(37±0.1)℃,在营养液中连续通入含5%CO₂的氧气,使其分散为连续的微小气泡,由浴槽下口送入。浴槽容积25mL,营养液也由浴槽下口送入,多余营养液自动由浴槽上口侧管排出。

待标本稳定后,描记一段正常活动曲线,从浴槽上方按序加入供试药液,观察并记录子宫收缩频率幅度的变化。试验分为3组:治疗组为先加缩宫素(OXY)0.1U/次,1min后注入药液,使浴槽中营养液所含TJB组与SFE组按高、低剂量分别为36.0,9.0g·L⁻¹,每次加药后观察描记12min,观察、记录各组药对OXY致大鼠离体子宫条痉挛性收缩的缓解情况。预防组按上述浓度先加入各组药液,1min后再加入OXY。空白对照组仅加入OXY0.1U/次,作为模型对照。然后描记子宫条的活动情况,观察各组药物对缩宫素致大鼠离体子宫痉挛的保护作用,测取1,3,5,10min时离体子宫的收缩幅度,之后用营养液换洗3~4次,稳定10min后描记正常活动曲线。试验结果见表8,9。

治疗组与预防组的结果均表明,SFE工艺高、低剂量组与模型组相比可以显著降低离体大鼠子宫痉挛幅度($P < 0.05$),说明对缩宫素引起的离体大鼠子宫痉挛有显著性抑制作用;SFE工艺高、低剂量组降低离体大鼠子宫痉挛幅度的作用均强于TJB高、低剂量组,且有显著性差异($P < 0.05$),表明SFE

表 8 各药物组对大鼠离体子宫收缩幅度的影响 (治疗组, $\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量 /g·L ⁻¹	药前 /mV	1 min /mV	3 min /mV	5 min /mV	10 min /mV
模型组	/	1.31 ± 0.71	3.66 ± 1.52	4.02 ± 1.77	4.13 ± 1.87	4.14 ± 1.91
TJB 高剂量	36.0	1.23 ± 0.63	3.52 ± 1.51	3.95 ± 0.72	3.92 ± 0.69	3.97 ± 0.95
SFE 高剂量	36.0	1.27 ± 0.68	2.52 ± 0.79 ^{1,2)}	2.43 ± 0.69 ^{1,2)}	2.28 ± 0.75 ^{1,2)}	1.68 ± 0.96 ^{1,2)}
TJB 低剂量	9.0	1.31 ± 0.67	3.56 ± 1.41	3.93 ± 1.50	3.97 ± 1.36	3.90 ± 1.47
SFE 低剂量	9.0	1.25 ± 0.65	2.83 ± 0.78 ^{1,3)}	2.78 ± 0.82 ^{1,3)}	2.66 ± 0.89 ^{1,3)}	2.58 ± 0.78 ^{1,3)}

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$; 与 TJB 高剂量组比较²⁾ $P < 0.05$; 与 TJB 低剂量组比较³⁾ $P < 0.05$ 。

表 9 各药物组对大鼠离体子宫收缩幅度的影响 (预防组, $\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /g·L ⁻¹	药前 /mV	1 min /mV	3 min /mV	5 min /mV	10 min /mV
模型组	-	1.31 ± 0.71	3.66 ± 1.52	4.02 ± 1.77	4.13 ± 1.87	4.14 ± 1.91
TJB 高剂量	36.0	1.26 ± 0.63	3.51 ± 1.13	3.93 ± 0.56	3.95 ± 0.78	3.93 ± 0.49
SFE 高剂量	36.0	1.25 ± 0.68	1.92 ± 0.53 ^{1,2)}	1.83 ± 0.49 ^{1,2)}	1.62 ± 0.61 ^{1,2)}	1.38 ± 0.50 ^{1,2)}
TJB 低剂量	9.0	1.21 ± 0.67	3.61 ± 1.24	3.96 ± 1.33	4.07 ± 1.67	3.96 ± 1.70
SFE 低剂量	9.0	1.30 ± 0.65	2.52 ± 0.93 ^{1,3)}	2.43 ± 0.59 ^{1,3)}	2.39 ± 0.70 ^{1,3)}	2.37 ± 0.67 ^{1,3)}

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$; 与 TJB 高剂量组比较²⁾ $P < 0.05$; 与 TJB 低剂量组比较³⁾ $P < 0.05$ 。

工艺组的解痉作用比 TJB 组好。

2.3.3 各药物组对缩宫素致小鼠痛经模型的影响

雌性 KM 小鼠 60 只,随机分成 6 组,每组 10 只。分别为模型组 (蒸馏水),阳性对照组 (阿司匹林),SFE 高、低剂量组,TJB 高、低剂量组,低剂量组生药量分别为高剂量的 1/4。

各组小鼠按 2 mg·kg⁻¹体重每天,灌胃己烯雌酚混悬液,连续 9 d,从第 10 d 开始,上午灌胃己烯雌酚,下午分别给予上述各组药物,连续给药 3 d。末

次给药 45 min 后腹腔注射缩宫素 20 U·kg⁻¹,观察 15 min 内各组小鼠出现扭体反应的潜伏期和扭体次数,以扭体反应为子宫收缩 (痛经) 的指标,测定小鼠扭体抑制率、扭体潜伏期延长率。结果见表 10。

$$\text{扭体抑制率} = \frac{\text{模型组扭体次数} - \text{给药组扭体次数}}{\text{模型组扭体次数}} \times 100\%$$

$$\text{扭体潜伏期延长率} = \frac{\text{给药组扭体潜伏期} - \text{模型组扭体潜伏期}}{\text{模型组扭体潜伏期}} \times 100\%$$

表 10 各药物组对小鼠痛经模型的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	扭体潜伏期 /min	抑制率 /%	扭体数/次	抑制率 /%
模型	20.0	2.55 ± 1.27	-	16.44 ± 8.76	-
阳性	0.2	10.02 ± 1.46 ^{1,2)}	292.90	2.67 ± 1.15 ^{1,2)}	83.76
TJB 高剂量	40.0	3.75 ± 1.35 ^{1,2)}	47.06	9.20 ± 6.66 ^{1,2)}	44.04
SFE 高剂量	40.0	3.92 ± 1.61 ^{1,2)}	53.73	8.01 ± 3.46 ^{1,2)}	51.28
TJB 低剂量	10.0	3.07 ± 1.73 ¹⁾	20.39	12.21 ± 7.42 ¹⁾	25.73
SFE 低剂量	10.0	3.24 ± 1.78 ¹⁾	27.06	11.31 ± 5.72 ¹⁾	31.20

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$, ^{1,2)} $P < 0.01$ 。

由表 10 可知,阳性组、TJB 高、低剂量组以及 SFE 高、低剂量组可以显著延长缩宫素致小鼠痛经模型的小鼠扭体潜伏期,显著减少小鼠的扭体次数 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),表明 TJB 组以及 SFE 组

与模型组相比具有很好的镇痛效果;SFE 高、低剂量组与 TJB 高、低剂量组相比可以延长缩宫素致小鼠痛经模型的小鼠扭体潜伏期,减少小鼠的扭体次数,表明 SFE 组镇痛效果较好。

3 讨论

痛经宝颗粒临床治疗原发性痛经具有确切的疗效,其组方由9味药组成,其中含有挥发油的药物有5种,分别为当归、肉桂、木香、三棱、莪术。现代研究表明当归、肉桂、木香中的挥发油对治疗原发性痛经具有很好的作用,特别是当归挥发油具有显著的抗子宫平滑肌痉挛作用,而痛经宝颗粒原工艺只对肉桂、木香挥发油进行了提取,而对当归挥发油未作提取,损失了部分有效成分,因此有必要对痛经宝颗粒中挥发油的提取工艺进行改进和优化,增加当归挥发油的提取,并对挥发油的提取方式作进一步深入研究,以提高制剂的临床疗效。

以挥发油的得率和有效成分的含量为指标比较了当归单独提取、肉桂、木香合并提取挥发油的两种方法——超临界CO₂萃取法与水蒸气蒸馏法。有文献报道用GC-MS测定当归、肉桂和木香的挥发油成分^[7-9],本实验建立了HPLC测定当归挥发油中藁本内酯和肉桂、木香挥发油中桂皮醛、木香炔内酯与去氢木香内酯的含量,方法简便可靠,符合实验要求^[10]。

结果表明,对于上述3种挥发油的提取,无论是挥发油的得率和有效成分的含量都是超临界CO₂萃取法较好,当归挥发油的得率超临界CO₂萃取法是水蒸气蒸馏法的6.2倍,藁本内酯含量是水蒸气蒸馏法的4.7倍;肉桂、木香挥发油的得率超临界CO₂萃取法是水蒸气蒸馏法的5.7倍,桂皮醛、木香炔内酯、去氢木香内酯的含量分别是水蒸气蒸馏法的3倍、120倍、11.7倍,尤其以木香挥发油中有效成分增加的最多。超临界CO₂萃取法与水蒸气蒸馏法提取各挥发油的条件分别经过正交试验优选得来,水蒸气蒸馏法提取时间长,提取温度高,而超临界CO₂萃取法提取温度低,提取时间短,可大量保存对热不稳定及易氧化的成分,这也是2种提取方法挥发油得率和有效成分含量相差甚远的原因。此外,超临界CO₂萃取法工艺简单,无溶剂残留,适合工业化生产。

药效学实验结果表明,超临界CO₂萃取法提取挥发油工艺与痛经宝原工艺比较,在镇痛作用上略有提高,而在解痉作用上有明显提高,而子宫痉挛是引起原发性痛经的主要原因,通过解除子宫痉挛可以达到治疗原发性痛经的目的,因此挥发油组分是痛经宝颗粒治疗原发性痛经不可或缺的组分。经过挥发油提取工艺的改进与优化,必将提高痛经宝制剂的临床疗效,使其更好地发挥治疗原发性痛经的作用。

[参考文献]

- [1] 蔡少青,郑汉臣. 药用植物学与生药学[M]. 北京:人民卫生出版社,2004:430.
- [2] 严辉,宋秉生,钱大玮,等. 我国不同产地当归药材质量的分析与评价[J]. 中草药,2009,30(12):1988.
- [3] 付强,杜晓曦,张萍,等. 超临界CO₂萃取法与水蒸气蒸馏法提取肉桂挥发油的比较研究[J]. 中国中药杂志,2007,32(1):69.
- [4] 刘圆,彭镰心,刘超,等. 木香、川木香、土木香的高效液相色谱指纹图谱鉴别[J]. 药物分析杂志,2006,26(11):1574.
- [5] 王峻,肖洪彬. 木香抗实验性胃溃疡的药效学研究[D]. 哈尔滨:黑龙江中医药大学,2008.
- [6] 中国药典. 一部[S]. 2010:1174.
- [7] 陶玲,黄际薇,麦海燕,等. 肉桂挥发油的超临界CO₂萃取与水蒸气蒸馏法提取的比较分析[J]. 分析测试学报,2004,23(4):65.
- [8] 易海燕,何桂霞,郭建生,等. 超临界CO₂萃取和水蒸气蒸馏法提取木香挥发油的比较研究[J]. 湖南中医药大学学报,2010,30(1):34.
- [9] 张金渝,王元忠,赵振玲,等. 云当归挥发油化学成分的气相色谱——质谱联用分析[J]. 时珍国医国药,2010,21(1):33.
- [10] 贾晓斌,王丽静,陈彦,等. HPLC测定肉桂、木香中桂皮醛、木香炔内酯和去氢木香内酯[J]. 中成药,2010,32(3):459.

[责任编辑 全燕]