

·工艺研究·

芎藭汤加味方的提取工艺优选研究及药效学评价

孙 蓉¹, 冯 群², 张亚国³, 迟雪洁⁴(1. 山东省中医药研究院, 山东 济南 250014; 2. 天津中医药大学, 天津 300193; 3. 济宁市药品检验所, 山东 济宁 272000; 4. 潍坊市中医院, 山东 潍坊 261041)

摘要: **目的** 优选芎藭汤加味方的处方工艺, 通过药效学试验和急性毒性试验进行药效剂量筛选和初步安全性评价。 **方法** 采用正交试验法对挥发油、核桃油提取工艺与非挥发性成分的乙醇回流提取工艺条件进行筛选, 单因素试验法对挥发油后水提液醇沉试验的乙醇浓度考察; 采用大鼠局灶性脑缺血模型筛选提取方法改良后药物的剂量, 并采用小鼠急性毒性试验法对药物安全性进行初步考察。 **结果** 芎藭汤加味方最佳提取工艺为: 川芎、当归粉碎过 10 目筛, 加 10 倍量水浸泡 4 h, 水蒸气蒸馏提取 6 h, 滤液浓缩备用, 药渣保留; 将 150 ℃条件下加热 1.5 h 灭酶后的核桃仁粉碎至粗粉, 加入 4 倍量石油醚, 浸泡提取 4 次, 每次 40 min, 药渣保留; 对川芎、当归提油后药渣合并核桃仁药渣用 10 倍量 70 % 乙醇提取 3 次, 每次 1 h。药物对大鼠局灶性脑缺血的有效剂量为 3.78 g·kg⁻¹, 折算成临床 70 kg 的成人每日用量为 42 g。小鼠最大给药量(MLD)为 120.96 g·kg⁻¹, 相当于临床 70 kg 的成人每公斤体质量日用量的 201.6 倍。 **结论** 该优选提取工艺稳定可行, 适用于芎藭汤加味方的提取。芎藭汤加味方对局灶性脑缺血有保护作用, 且安全、低毒。

关键词: 芎藭汤加味方; 正交试验; 提取工艺; 局灶性脑缺血; 急性毒性

中图分类号: R285.5; R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2014)06-0750-06

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2014.06.026

Optimization of Extraction Process and Pharmacodynamic Evaluation of Modified *Xiongqiong* Decoction

SUN Rong¹, FENG Qun², ZHANG Yanan³, CHI Xuejie⁴(1. Shandong Academy of Chinese Medicine, Ji'nan 250014 Shandong, China; 2. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China; 3. Jining Institute For Drug Control, Jining 272000 Shandong, China; 4. Weifang Traditional Chinese Medical Hospital, Weifang 261041 Shandong, China)

Abstract: **Objective** To optimize the extraction process of modified *Xiongqiong* decoction, and to evaluate the effective dosage and safety of the medicine by pharmacodynamic experiment and acute toxicity test. **Methods** Alcohol-reflux extraction process of volatile oil, walnut oil and non-volatile components was optimized with orthogonal test, while the concentration of alcohol in the test of water extraction and ethanol precipitation after volatile oil extraction was investigated with single factor experiments. Focal rat brain ischemia model was established to screen the effective dosage of the medicine extracted from modified *Xiongqiong* decoction, and mouse acute toxicity test was used to inspect its safety preliminarily. **Results** Optimal extraction process of modified *Xiongqiong* decoction was as follows: Rhizoma Chuanxiong and Radix Angelicae Sinensis were crushed and screened through mesh size of 10, the mixture was soaked in 10-fold water amount for 4 h, the filtrate was concentrated and the medicinal residue was in reserve after extracted with steam distillation for 6 h; walnuts were crushed into rough grains after heating at 150 ℃ for 1.5 h to remove the enzyme, the coarse powder was extracted by soaking with 4-fold amount petroleum ether for four times, 40 minutes for each time, and the medicinal residue was in reserve. The dregs of the decoction were extracted with 10-fold amount of 70 % ethanol for 3 times, one hour per time. Effective dosage of the extract for

收稿日期: 2014-08-05

作者简介: 孙蓉, 女, 研究员, 博士生导师, 研究方向: 中药药理与毒理。Email: sunrong107@163.com。

基金项目: 国家科技重大新药创制专项——中药复方药理学研究及药效学评价关键技术(2009ZX09502-015)。

protecting rat focal brain ischemia was $3.78 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, which was equal to the daily dosage of 42 g of dried medicine for a person weighed 70 kg. Minimal lethal dose of the extract in mice was $120.96 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, which was equal to 201.6 times of 70 kg person's daily dried medicine expenses. **Conclusion** The optimized extraction process for modified *Xiongqiong* decoction is stable and feasible, and the extract is safe and effective to protect focal brain ischemia.

Keywords: Modified *Xiongqiong* decoction; Orthogonal test; Extraction process; Focal cerebral ischemia; Acute toxicity

芎藭汤加味方源于《备急千金药方》的芎藭汤合《医方择要》治大便不通方,由川芎、当归、核桃仁组成,方中以川芎为君药,当归为臣,核桃仁为佐药。本方具有行气活血、补肾益智的功效,临床上主要用于治疗肾虚血瘀之善忘、痴呆,近事遗忘,腰膝酸软,夜尿频多,大便干结,肌肤欠润,甚者神情呆滞,癫狂时作,舌暗有瘀斑瘀点,脉细涩等病症。现代研究发现其具有抗脑缺血、促进血小板解聚、抑制血管平滑肌细胞增生、抗氧化、提高膜稳定性等药理作用^[1-6]。目前对芎藭汤加味方研究较少,临床多用药材水煎液。本实验室前期研究发现^[7],以“先分别制备芎藭汤加味方的挥发油、核桃油和药渣醇提液,再将三者合并、浓缩”工艺所得提取物的有效成分保留的最全面,对小鼠全脑缺血和缺氧损伤程度的改善作用最强,均优于传统水煎煮的工艺。因此,在保证药物功效的前提下,通过正交试验设计,对芎藭汤加味方的上述提取工艺进行优选。通过对动物全脑缺血再灌注损伤模型的保护作用和急性毒性研究,摸索并筛选复方提取物的有效剂量和急毒结果,通过“质量-药效-毒性”综合评价模式的工艺优选研究思路,保证芎藭汤加味方疗效,为后期芎藭软胶囊的制备奠定基础,为其临床试验提供参考。

1 材料

1.1 仪器及试剂 UV-2102PC 型紫外分光光度计,上海尤尼柯公司; Sartorius/BS210S 分析天平,北京赛多利斯天平有限公司; DZTW 型调温电热套,北京市永光明医疗仪器厂; DHG-9076A 型电热恒温鼓风干燥箱,上海精宏实验设备有限公司; RE52CS-1 旋转蒸发仪,上海亚荣生化仪器厂; B-260 恒温水浴锅,上海亚荣生化仪器厂; SHB-III 循环水式多用真空泵,郑州长城科工贸有限公司; LK-600A 摇摆式高速中药粉碎机,浙江温岭市创立药材器械厂。

阿魏酸对照品,批号:110773-201012,中国药品生物制品鉴定所;甲醇,色谱纯,天津市康科得科技有限公司;冰乙酸,分析纯,山东淄博丰泰化学试

剂有限公司;石油醚,分析纯,山东莱阳市康德化工有限公司;95%乙醇,山东鲁强玻璃仪器有限公司;水为超纯水。

1.2 药材 川芎(批号:20100312)、当归(批号:20100405)、核桃仁(批号:20100308),均购自安徽世贸医药有限公司,经山东省中医药研究院林慧彬研究员鉴定:川芎为伞形科植物川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort.的干燥根茎;当归为伞形科植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels 的干燥根;核桃仁为胡桃科植物胡桃 *Juglans regia* Linn 的干燥成熟种子。3味药材均按照《中华人民共和国药典》2010 版(一部)规定的各药材检测项下要求检验,符合规定。川芎中含阿魏酸 0.46%;当归中含阿魏酸 0.17%,含挥发油 $7.35 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

1.3 动物 SPF 级昆明种小鼠,雌雄各半,健康适龄,体质量 18~22 g,购自山东大学实验动物中心,合格证号:SCXK(鲁)20090001。

2 方法与结果

2.1 提取工艺优化研究

2.1.1 挥发油提取工艺条件的优选

2.1.1.1 正交试验 根据药物本身理化性质,结合生产实际,挥发油提取采用水蒸气蒸馏工艺,选药材粒度、溶剂倍量、浸泡时间、提取时间作为考察因素,以挥发油提取率为考察指标,按下式计算。

挥发油提取率($\text{mL} \cdot \text{kg}^{-1}$) = 挥发油体积(mL) / 川芎与当归总质量(kg)。川芎当归按 4:2 比例称 9 份,共约 36 g,分别置圆底烧瓶中,按表 1 参数用水蒸气蒸馏法进行正交试验考察。试验安排及结果见表 2,方差分析见表 3。由表 2~3 可知,4 个因素对挥发油提取工艺的影响均无显著性差异,影响顺序为 $D > A > C > B$ 。对于 D 因素 $K_3 > K_2 > K_1$, K_3 、 K_2 相差不大,考虑药渣还要醇提,保留非挥发性成分不致因为加热时间过长导致破坏,故选水平 2,即提取 6 h;对于 A 因素 $K_3 > K_2 > K_1$,为使药渣不致因为药材粉碎过细而转移时有损失,故选水平 2,即药材饮片粉碎

过 10 目。为减少药材有效成分损失，结合效率和成本，选择最佳方案为 A₃B₂C₃D₂，即药材粉碎过 10 目筛，加 10 倍水浸泡 4 h，提取时间为 6 h。

表 1 挥发油提取正交设计的因素和水平

Table 1 Factors and the levels for volatile oil extraction process orthogonal design

水平	A	B	C	D
	药材粒度	溶剂用量 / 倍	浸泡时间 / h	提取时间 / h
1	饮片	8	0	3
2	10 目	10	4	6
3	20 目	12	8	9

表 2 挥发油提取正交试验结果

Table 2 Volatile oil extraction orthogonal experiment results

试验号	因素				挥发油提取率 /mL·kg ⁻¹
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	2.73
2	1	2	2	2	6.74
3	1	3	3	3	5.88
4	2	1	2	3	8.11
5	2	2	3	1	5.33
6	2	3	1	2	6.38
7	3	1	3	2	8.11
8	3	2	1	3	8.17
9	3	3	2	1	5.48
K ₁	0.512	0.632	0.576	0.451	
K ₂	0.661	0.675	0.678	0.708	
K ₃	0.725	0.591	0.644	0.739	
R	0.213	0.084	0.102	0.288	

表 3 挥发油提取正交设计方差分析表

Table 3 Analysis of variance for volatile oil extraction process orthogonal design

方差来源	离差平方和	自由度	F 值	显著性
A	0.072	2	7.20	P > 0.05
B	0.010	2	1.00	P > 0.05
C	0.016	2	1.60	P > 0.05
D	0.149	2	14.90	P > 0.05
误差 E	91.110	2		

注：F_{0.05}(2, 2)=19.0；F_{0.01}(2, 2)=99.0。

2.1.1.2 验证试验 川芎当归药材平行称取 3 份，粉碎过 10 目筛，加 10 倍水浸泡 4 h，提取 6 h，收集挥发油，计算提取率，结果挥发油平均提取率为 6.74 mL·kg⁻¹，RSD 为 2.60 %。证明该工艺条件具有重复性。

2.1.2 醇沉工艺条件优选 阿魏酸溶于热水、乙醇，预试验结果显示川芎与当归提完挥发油后的滤液中含阿魏酸，为提高有效成分含量，去除杂质，进行醇沉

工艺研究。主要影响因素有水提液密度、醇的浓度、醇沉温度、时间等。水提液的密度一般为 1.05 ~ 1.10，冷藏 24 h，因此仅对醇沉浓度优选，以醇沉溶液阿魏酸提取率为指标^[8-10]。

采用 HPLC 法测定阿魏酸含量，色谱柱以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂(250 × 4.6 mm, 5 μm)；流动相为甲醇-1 %醋酸溶液(30 : 70)，流速 1 mL·min⁻¹，柱温 25 ℃，检测波长为 321 nm。取阿魏酸对照品适量，精密称定，置棕色量瓶中，加 70 %甲醇制成每 1 mL 含 20 μg 的溶液，即得对照品溶液。取各工艺提取药液 10 mL，置于蒸发皿中浓缩成干膏，各取约 0.5 g，精密称定，置具塞锥形瓶中，精密加入 70 %甲醇 50 mL，密塞，称定质量，加热回流 30 min，放冷，再称定质量，用 70%甲醇补足减失的质量，摇匀，静置，取上清液，滤过，取续滤液，即得供试品溶液。分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液各 20 μL，注入液相色谱仪，进行相关测定。

称适量川芎与当归，按上述挥发油优选条件，合并提取挥发油，滤过，滤液定容至 600 mL，取滤液每份 100 mL，浓缩至相对密度为 1.05 ~ 1.10，按递减方式分别加入乙醇制成 80 %、70 %、60 %、50 %、40 %的醇沉浓度。静置 24 h，使沉淀，取上清液回收乙醇并转移至已干燥蒸发皿中，水浴蒸干，105 ℃干燥 3 h，置干燥器中冷却 0.5 h，迅速称质量，按下式计算干膏得率。

干膏得率(%)=(浸膏质量(g) × 600 mL)/(川芎与当归药材总质量(g) × 100 mL) × 100；阿魏酸提取率(mg·g⁻¹)=阿魏酸含量(mg)/川芎与当归药材总质量(g)。

醇沉浓度为 70 %时得到的浸膏中阿魏酸含量较高，所以选醇沉浓度为 70 %，见表 4。

表 4 醇沉工艺优选

Table 4 Progress optimization of water extraction and alcohol precipitation

试验号	醇沉浓度 /%	干膏得率 /%	阿魏酸提取率 /mg·g ⁻¹
1	80	5.21	0.23
2	70	6.32	0.27
3	60	6.44	0.20
4	50	8.24	0.14
5	40	9.32	0.11

2.1.3 核桃油提取工艺参数优化

2.1.3.1 正交试验 核桃仁中含大量酶，需先在 150 ℃条件下，加热 1.5 h 灭活。将灭酶后核桃仁粉碎至

粗粉后再进行试验。以核桃油提取率为考察指标，对石油醚的用量、浸泡时间、次数进行优选。因素水平见表 5，试验安排及结果见表 6，方差分析见表 7。

核桃油提取率($\text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$)=核桃油体积(mL)/核桃仁质量(kg)。

由分析可知，各因素影响顺序为 $A>B>C$ ，说明石油醚用量为显著性影响因素，B、C 因素无显著性影响。综合考虑确定最佳提取工艺参数为 $A_3B_2C_2$ ，即加 4 倍量石油醚，浸泡提取 4 次，每次 40 min。

表 5 核桃油提取正交设计的因素和水平

Table 5 Factors and the levels for walnut oil extraction process orthogonal design

水平	A	B	C
	石油醚用量 / 倍	浸泡时间 /min	浸提次数 / 次
1	2	30	3
2	3	40	4
3	4	50	5

表 6 核桃油提取正交试验结果

Table 6 Walnut oil extraction orthogonal experiment results

试验号	因素				核桃油提取率 / $\text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	413.5
2	1	2	2	2	452.5
3	1	3	3	3	458.1
4	2	1	2	3	471.2
5	2	2	3	1	513.1
6	2	3	1	2	519.0
7	3	1	3	2	523.2
8	3	2	1	3	522.4
9	3	3	2	1	539.2
K_1	44.137	46.930	48.497	48.860	
K_2	50.110	49.600	48.763	49.823	
K_3	52.827	50.543	49.813	48.390	
R	8.690	3.613	1.316	1.433	

表 7 核桃油提取正交设计方差分析表

Table 7 Analysis of variance for walnut oil extraction process orthogonal design

方差来源	离差平方和	自由度	F 值	显著性
A	118.577	2	40.79	$P<0.05$
B	21.075	2	7.25	$P>0.05$
C	2.907	2	1.00	$P>0.05$
误差 E	2.910	2		

注： $F_{0.05}(2, 2)=19.0$ ； $F_{0.01}(2, 2)=99.0$ 。

2.1.3.2 验证试验 核桃仁平行称取 3 份，灭酶，将核桃仁粉碎至粗粉，加入 4 倍量石油醚，浸泡提取 4 次，每次 40 min。合并 4 次提取液，85 ℃中恒温加

热，使石油醚挥发，至核桃油无石油醚味^[1]。计算核桃油平均提取率为 $520.7\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ ，RSD 为 0.22 %。证明该工艺条件具有重复性。

2.1.4 乙醇提取工艺参数优化

2.1.4.1 正交试验 分别提取挥发油和核桃油 12 份，9 份做正交试验，3 份做验证试验。分别合并川芎、当归药渣与核桃仁药渣，共 9 份，做醇提正交试验，以阿魏酸提取率为指标，以乙醇浓度、溶剂倍数、提取时间、次数为考察因素。通过预试验，确定按以下因素水平，见表 8。试验安排及结果见表 9，方差分析见表 10。

干膏得率 (%)=干膏质量 (g)/处方药物总质量 (g)×100；阿魏酸提取率($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)=阿魏酸含量(mg)/处方药物总质量(g)。

由分析可知，各因素影响顺序为 $A>B>C$ ，说明 A 因素、D 因素均为显著性影响因素，B、C 因素无显著性影响。综合考虑确定醇提最佳提取工艺参数为 $A_2B_3C_1D_3$ ，即 10 倍量 70 %乙醇提取 3 次，每次 1 h。

表 8 乙醇提取正交设计的因素和水平

Table 8 Factors and the levels for orthogonal design of extraction with ethanol

水平	A	B	C	D
	乙醇浓度 /%	提取时间 /h	溶剂倍数 / 倍	提取次数 / 次
1	50	2	10	1
2	70	1.5	8	2
3	90	1	6	3

表 9 乙醇提取正交试验结果

Table 9 Results of extraction with ethanol orthogonal experiment

试验号	因素				干膏得率 /%	阿魏酸提取率 / $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	综合指标
	A	B	C	D			
1	1	1	1	1	5.53	0.26	50.69
2	1	2	2	2	7.69	0.31	65.88
3	1	3	3	3	6.43	0.48	74.86
4	2	1	2	3	7.89	0.67	99.11
5	2	2	3	1	5.50	0.37	60.40
6	2	3	1	2	8.07	0.65	98.21
7	3	1	3	2	3.01	0.39	49.84
8	3	2	1	3	4.29	0.44	60.67
9	3	3	2	1	2.36	0.25	34.09
K_1	63.810	66.547	69.857	48.393			
K_2	85.907	62.317	66.360	71.310			
K_3	48.200	69.053	61.700	78.213			
R	37.707	6.736	8.157	29.820			

注：综合指标 = 干膏得率 / 最大干膏得率 × 0.4 × 100+ 阿魏酸提取率 / 阿魏酸最大提取率 × 0.6 × 100。

表 10 乙醇提取正交设计方差分析表

Table 10 Analysis of variance for orthogonal design of extraction with ethanol

方差来源	离差平方和	自由度	F 值	显著性
A	2 153.727	2	30.963	$P < 0.05$
B	69.559	2	1.000	$P > 0.05$
C	100.473	2	1.444	$P > 0.05$
D	1 462.062	2	21.019	$P < 0.05$
误差 E	69.560	2		

注: $F_{0.05(2,2)}=19.0$; $F_{0.01(2,2)}=99.0$ 。

2.1.4.2 验证试验 分别合并保留的 3 份川芎、当归药渣与核桃仁药渣,置圆底烧瓶,加 10 倍量 70%乙醇提取 3 次,每次 1 h,提取液回收乙醇并浓缩至干膏,测定阿魏酸含量。结果干膏得率的平均为 7.62 %, RSD 为 3.37 %,阿魏酸提取率平均值 0.67 mg·g⁻¹, RSD 为 2.30 %,证明该工艺条件具有重复性。

2.2 药效学剂量筛选研究与急毒研究 按工艺优选条件制备供试药物,进行剂量筛选与急毒研究。

2.2.1 药效学剂量筛选研究

2.2.1.1 方法 取雄性 Wistar 大鼠 70 只,随机分为 7 组:假手术组,模型组,芎茺汤加味方高、中、低剂量组,阳性药尼莫地平组,每组 10 只。大鼠给芎茺汤加味方高、中、低剂量组剂量分别为 7.56, 3.78, 1.89 g·kg⁻¹;阳性药剂量为 10.8 mg·kg⁻¹;假手术组与模型组给予等体积蒸馏水灌胃。以上各组给药体积为 10 mL·kg⁻¹,每天灌胃 1 次,连续 7 d。

药后,大鼠腹腔注射水合氯醛 10 mL·kg⁻¹,麻醉、仰位固定,参考文献^[12]方法进行大鼠局灶性脑缺血模型的复制。假手术组大鼠不插入鱼线,其余操作相同。鱼线插入术后 1 h,小心抽出鱼线复灌,假手术分离术后 1 h,逐层缝合局部组织、肌肉、皮下筋膜及皮肤。手术后 24 h,参照 Kuluz 等^[13]的分级标准和文献评分标准^[14],进行神经行为学评价:Ⅰ级,行为完全正常(0 分);Ⅱ级,左侧前爪不能完全展开(1 分);Ⅲ级,前行时向左面划圈(2 分);Ⅳ级,向左侧倾倒(3 分);Ⅴ级,不能正常行走(4 分)。评分后,依照文献进行脑组织 TTC 染色,计算脑梗塞范围和脑体比值(%)=全脑质量(g)/体质量(g)×100;脑梗塞范围(%)=梗死脑组织质量(g)/[梗死脑组织质量(g)+正常脑组织质量(g)]×100。

2.2.1.2 对局灶性脑缺血模型大鼠神经功能缺损症状的影响 与模型组比较,芎茺汤加味方各组大鼠的神经行为学评分差异均有统计学意义($P < 0.05$),其中剂量组差异有非常统计学意义($P < 0.01$)。芎茺汤加

味方中剂量组与阳性药组比较,差异有统计学意义($P < 0.01$)。与假手术组比较,模型组大鼠全脑组织质量,因在建模后发生脑细胞变性、水肿及间质组织炎症反应而使其质量增加($P < 0.05$),说明模型复制成功。芎茺汤加味方中剂量组对局灶性脑缺血模型大鼠全脑组织质量增加的影响与模型组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。TTC 染色结果可知,与模型组比较,芎茺汤加味方各组及阳性药组均能够有效改善脑梗塞范围($P < 0.01$);芎茺汤加味方高、中剂量组与阳性药组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 11。

表 11 各组对局灶性脑缺血大鼠的影响($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 11 Effects of each group on local cerebral ischemia in rat

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	神经行为学评分 /分	脑体比值 /%	梗塞范围 /%
假手术组	-	0.00 ± 0.00	0.418 ± 0.037	0.00 ± 0.00
模型组	-	3.56 ± 1.57	0.473 ± 0.045 [#]	27.56 ± 4.70
阳性药组	0.010 8	1.57 ± 0.89 [*]	0.446 ± 0.033	14.72 ± 5.41 ^{**}
芎茺汤高剂量组	7.56	1.42 ± 0.53 [*]	0.451 ± 0.031	12.71 ± 5.52 ^{**△}
芎茺汤中剂量组	3.78	1.28 ± 0.69 ^{**△}	0.438 ± 0.044 [*]	13.58 ± 7.12 ^{**△}
芎茺汤低剂量组	1.89	1.68 ± 0.87 [*]	0.457 ± 0.050	15.64 ± 6.35 ^{**}

注:与假手术组比较,[#] $P < 0.05$;与模型组比较,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$;与阳性药组比较,[△] $P < 0.05$ 。

2.2.2 急性毒性试验

2.2.2.1 方法 预试验结果表明无法得出半数致死量(LD₅₀),提示该复方制剂是安全的,改做小鼠最大给药量(MLD)试验。正式试验:昆明种小鼠 40 只,随机分为芎茺汤加味方组和空白对照组,每组 20 只,雌雄各半。实验前禁食不禁水 12 h,以生药量 3.024 g·mL⁻¹(最大浓度),空白对照组灌胃蒸馏水,每只小鼠按 40 mL·kg⁻¹灌胃。连续给药 3 次(每隔 8 h 给药 1 次),每次记录药后 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h 及药后每天的毒性反应及死亡情况,每天记录存活小鼠体质量。死亡动物即刻尸检,肉眼观察主要脏器变化^[15]。

2.2.2.2 一般情况 药后观察未见明显异常,1 h 后正常饮食饮水,给药后 14 d 内毛色、活动、精神状态、二便均正常,未见明显毒性反应且无死亡,但体质量增长较慢,明显低于空白对照组,8 d 后趋于正常,见图 1。1 d 内给小鼠灌胃最大浓度药物 3 次,未见小鼠死亡及明显的毒性症状,可测得该复方提取物的 MLD 为 120.96 g·kg⁻¹,相当于临床 70 kg 的成人每公斤体质量日用量的 201.6 倍。一般认为小鼠 MLD 相当于成人临床用量的 100 倍以上则较为安全^[16],据此改工艺优化后所得复方提取物毒性不明显,可考虑制

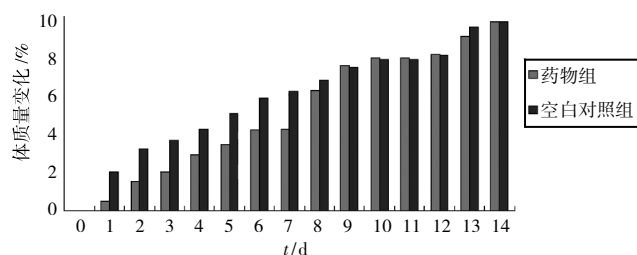


图 1 芎蒭汤加味方提取物对小鼠体质量变化的影响

Figure 1 Effects of extract of modified *Xiongqiong* decoction on weight changes of mice

成适合患者服用的剂型, 供临床应用及长期毒性进一步研究。

2.3 工艺验证研究 分别称取 10 个处方量的川芎、当归、核桃仁药材各 3 份, 川芎、当归粉碎过 10 目筛, 加 10 倍量水浸泡 4 h, 提取挥发油时间为 6 h。提挥发油后的滤液用 70 %乙醇醇沉, 上清液保留。核桃仁加热 1.5 h (150 ℃) 灭酶, 粉碎至粗粉, 加入 4 倍量石油醚, 浸泡提取 4 次, 每次 40 min。对川芎、当归提油后药渣合并核桃仁提油后药渣用 10 倍量 70%乙醇提取 3 次, 每次 1 h。合并乙醇醇沉上清液与乙醇提取液, 回收乙醇, 浓缩至干浸膏。研究结果为平均干膏得率 13.1 %, RSD 为 1.17 %, 阿魏酸平均提取率为 0.77 mg·g⁻¹, RSD 为 2.69 %。

3 讨论

本实验采用正交试验, 以各步骤中主要成分为指标, 确定芎蒭汤加味方最佳提取工艺为: ①挥发油提取: 川芎、当归粉碎过 10 目筛, 加 10 倍量水浸泡 4 h, 提取 6 h。滤液用浓度为 70 %乙醇进行醇沉。滤渣保留。②核桃油提取: 核桃仁先在 150 ℃下加热 1.5 h, 粉碎至粗粉, 加入 4 倍量石油醚, 浸泡提取 4 次, 每次 40 min。滤渣保留。③药渣醇提: 对川芎、当归提油后药渣合并核桃仁提油后药渣用 10 倍量 70 %乙醇提取 3 次, 每次 1 h。④取浓缩后的水提液和醇提液, 混匀后浓缩; 再与挥发油、核桃油混匀。

本研究通过药物对大鼠局灶性脑缺血模型的药效学研究和药物对正常小鼠的急性毒性试验, 对芎蒭汤加味方提取工艺进行验证和评价。剂量筛选试验表明, 芎蒭汤加味方提取物高、中、低剂量组对鱼线法造成的大鼠局灶性脑缺血模型神经行为学、脑体比值、脑梗塞范围均有不同程度的改善作用。其中, 芎蒭汤中剂量可显著地改善局灶性脑缺血大鼠的神经功能缺损症状, 并减轻脑缺血模型水肿。故选择中剂量为其最佳剂量。芎蒭汤加味方中剂量为 3.78 g·kg⁻¹,

折算成临床 70 kg 的成人每日用量为 42 g。小鼠急性毒性试验结果表明, 小鼠 MLD 为 120.96 g·kg⁻¹, 相当于临床 70 kg 的成人每公斤体质量日用量的 201.6 倍, 该复方提取物急性毒性不明显, 可供临床应用及实验研究。

本实验首次针对芎蒭汤加味方提取工艺的各个步骤具体参数的优化, 进行正交试验设计, 确定各有效组分提取的最优参数, 既保证了芎蒭汤加味方中有效组分保留的全面性, 又确保其行气活血、补肾益智的功效。上述制备工艺重复性好、可操作性强、稳定可行。

参考文献:

- [1] 范柳, 孙继虎. 川芎、当归萃取液对实验性急性脑梗死大鼠行为和脑组织损伤的影响[J]. 中国临床药学杂志, 2002, 11(2): 81-83.
- [2] 杨艳娜, 李伟君, 孙少伯, 等. 当归超滤物抗阿霉素致心肌细胞损伤的作用研究[J]. 医学研究杂志, 2014, 43(5): 55-58.
- [3] 孙蓉, 张亚因, 吕丽莉. 当归基于功效物质基础的抗脑缺血药理作用研究进展[J]. 中国药物警戒, 2011, 8(10): 615-618.
- [4] 迟雪洁, 孙蓉. 川芎基于功效物质基础的抗脑缺血药理作用研究进展[J]. 中国药物警戒, 2013, 10(6): 355-357.
- [5] 李岩, 东红, 李妍怡, 等. 当归多糖对慢性脑低灌注大鼠学习记忆能力的影响[J]. 甘肃科技纵横, 2013, 42(6): 116-118.
- [6] 李淑颖, 侯永忠, 葛志强. 川芎当归提取物对血管平滑肌细胞 MAPK 信号通路及周期蛋白的调控效应[J]. 中草药, 2006, 37(8): 1217-1221.
- [7] 冯群, 迟雪洁, 张亚因, 等. 基于物质基础和抗脑缺血作用的芎蒭汤加味方提取工艺研究[J]. 中国药物警戒, 2014, 12(11): 641-644.
- [8] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 (一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 38.
- [9] 容蓉, 陈明强, 吕青涛, 等. 正交实验结合高效液相色谱指纹图谱优选芎蒭汤醇提工艺[J]. 中国药学杂志, 2009, 44(8): 580-584.
- [10] 袁如文, 赵成国, 谢立敏, 等. HPLC 法测定当归中阿魏酸的含量[J]. 广州化工, 2014, 42(13): 112-113.
- [11] 黄黎慧, 张晓燕, 倪小英. 水酶法提取核桃油工艺研究[J]. 粮食科技与经济, 2010, 35(4): 30-32.
- [12] 孙蓉, 吕丽莉, 郭守东, 等. 芍药苷对局灶性脑缺血模型及血脑屏障的影响[J]. 哈尔滨商业大学学报(自然科学版), 2005, 21(4): 405-410.
- [13] Kuluz JW, Prado RJ, Dietrich WD, et al. The effect of nitric oxide synthase inhibition on infarct volume after reversible focal cerebral ischemia in conscious rats[J]. Stroke, 1993, 24(12): 2023-2029.
- [14] 陈春富, 常高峰, 郭述芳, 等. 大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤模型[J]. 中国病理生理杂志, 1997, 13(1): 106-107.
- [15] 徐叔云, 卞如谦, 陈修. 药理实验方法学[M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 227-231.
- [16] 谢秀琼. 中药新制剂开发与应用[M]. 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2000: 540.

(编辑: 邓响潮)