

## 车前子不同炮制品的止泻作用及星点设计-效应面优化法优选车前子炒制工艺的研究

张 丹, 何 颖, 周 洁, 刘明华\*

泸州医学院药学院, 四川 泸州 646000

**摘 要:** **目的** 研究车前子 *Plantaginis Semen* 不同炮制品的止泻作用; 优化车前子炒制工艺。 **方法** 采用醇水双提法提取车前子不同炮制品的有效成分, 以腹泻指数为指标, 观察不同炮制品对蓖麻油所致小鼠腹泻模型的影响; 以京尼平苷酸、毛蕊花糖苷、水浸出物、醇浸出物的量为评价指标, 采用星点设计-效应面优化法 (CCD-RSM) 优选车前子最佳炒制工艺参数。 **结果** 车前子炒品、酒品和盐品对小鼠腹泻具有一定抑制作用, 抑制作用强弱顺序为炒品 > 酒品 ≥ 盐品, 而生品有进一步加重小鼠腹泻的趋势; 车前子最佳炒制工艺条件为取车前子饮片, 210 °C 炒制 5 min。 **结论** 车前子不同炮制品的止泻作用存在差异; CCD-RSM 科学性强、预测性好, 所得的车前子最佳炒制工艺合理可行。

**关键词:** 车前子; 不同炮制品; 星点设计-效应面优化法; 炒制工艺; 腹泻指数

中图分类号: R283.1; R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2014)03-0355-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.03.011

## Antidiarrheal effects of different processed products of *Plantaginis Semen* and optimization of processing technology by CCD-RSM

ZHANG Dan, HE Ying, ZHOU Jie, LIU Ming-hua

Pharmacy Department, Luzhou Medical College, Luzhou 646000, China

**Abstract:** **Objective** To study the antidiarrheal effects of different processed products of *Plantaginis Semen* and to optimize the processing technology. **Methods** Alcohol and water were used as extracting agents of different processed products, diarrhea index was used as the index, and the antidiarrheal effects of different processed products on diarrhea mouse model induced by castor oil were observed. Taking the contents of geniposidic acid, acteoside, water extract, and alcohol extract as indexes, the stir-frying time and temperature of the processed products were optimized using star design-response surface optimization method (CCD-RSM). **Results** The fried-, wine-, and salt-processed products of *Plantaginis Semen* have certain inhibitory effect on the diarrhea of mice. The order of different processed products that restrain diarrhea respectively was: stir-fried product > stir-fried with yellow alcohol products ≥ stir-fried with salt, but the raw product could increase diarrhea of mice; The best processing technology was as follows: taking some *Plantaginis Semen*, fried for 5 min at 210 °C. **Conclusion** There are differences in antidiarrheal effects of different processed products of *Plantaginis Semen*; CCD-RSM is scientific and predictable, and this process is rational and feasible.

**Key words:** *Plantaginis Semen*; different processed products; star design-response surface optimization method; processing technology; diarrhea index

车前子 *Plantaginis Semen* 首载于《神农本草经》, 至今已有 1 000 多年的药用历史, 具有清热利尿通淋、清肺化痰、清肝明目等功效, 炒后长于渗湿止泻、祛痰止咳<sup>[1-2]</sup>。车前子的炮制历史悠久, 其炮制方法历来注重炒法, 古代多使用酒炙, 但《中

国药典》2010 年版也只收载了盐炙品而没有酒炙品和清炒品, 其改变原因不得而知<sup>[3]</sup>。由于炮制后对车前子的成分及药效作用靶点和机制还没有得到清楚的认识, 而酒炙车前子方法为何流失, 是否需要重新认识都有待证明。

收稿日期: 2013-08-01

基金项目: 泸州医学院青年基金 (427)

作者简介: 张 丹 (1975—), 女, 副教授, 博士研究生, 四川省泸州医学院药学院, 研究方向为中药炮制、中药新制剂。

Tel: 18982700067 E-mail: ppkfoot7@163.com

\*通信作者 刘明华, 教授。Tel: 18982747516 E-mail: 99053808@qq.com

近年来研究表明,生车前子具有致泻作用,而炒车前子长于渗湿止泻,二者功效迥异,故本实验选取车前子不同炮制品对蓖麻油所致小鼠腹泻的影响进行初步研究,为其作用机制研究奠定基础<sup>[4]</sup>。目前,对车前子的研究多集中于药理作用,对炒制工艺的研究却相对较少,炒制是否合格常常依靠爆裂声和香气等经验判断,缺乏具体的工艺参数,并且炒制法温度跨度范围广,不易控制;炒制时间不易掌握,容易焦糊。为保证临床用药的准确性及利于工业化生产,本实验采取单因素结合星点设计-效应面优化法(CCD-RSM)<sup>[5-6]</sup>研究车前子炒制过程中各影响因素对不同有效成分的影响,为炮制原理的研究和规范车前子的炒制工艺奠定了基础。

## 1 仪器与材料

ICR 小鼠,泸州医学院实验动物中心,动物许可证号 SCXK(川)2008-17,雌雄兼用。

Ultimate3000 戴安高效液相仪(美国戴安公司);DGG-9030 电热恒温鼓风干燥箱(上海森信实验仪器有限公司);BP211D 型十万分之一电子天平、BP121S 型万分之一电子分析天平,德国赛多利斯公司;AS3120A 超声清洗器(天津奥特赛恩斯仪器有限公司);AR350+非接触式红外测温仪(香港恒高电子集团);自制小鼠代谢笼。

对照品京尼平苷酸(批号 111017)、毛蕊花糖苷(批号 120524),均购于四川省维克奇生物科技有限公司,质量分数均 $\geq 98\%$ ;颠茄磺苄啉片(含活性成分磺胺甲噁唑 0.4 g、甲氧苄啉 80 mg、颠茄流浸膏 8 mg,哈药集团制药六厂);甲醇(Fisher HPLC Grade);自制重蒸馏水;其余试剂均为分析纯。车前子,购于泸州百草堂中药饮片有限公司,经泸州医学院药学院生药教研室税丕先教授鉴定为车前科植物车前 *Plantago asiatica* L. 的干燥成熟种子。

## 2 方法与结果

### 2.1 车前子不同炮制品的制备

参照《中国药典》2010 年版一部和《现代中药炮制手册》<sup>[7]</sup>中车前子的不同炮制法,以生车前子为原料进行炮制,分别得到生车前子、炒车前子、盐炒车前子、酒车前子。生车前子:取原饮片,除去杂质,筛去灰屑;炒车前子:取净车前子置锅内,用文火炒至鼓起,色稍变深,有爆声时,取出放凉;盐车前子:取净车前子,置锅内用文火炒至鼓起有爆裂声时,喷淋盐水,继续炒干,有香气逸出时,

取出放凉;酒车前子:取净车前子,用黄酒拌匀,密闭 1 h,置锅内用文火炒至略带火色,取出放凉。

### 2.2 车前子不同炮制品对蓖麻油所致小鼠腹泻的影响<sup>[8-9]</sup>

**2.2.1 药液制备** 采用醇水双提法分别对每一种炮制品进行提取,具体过程:取车前子不同炮制品过 2 号筛,分别用 8 倍量 75%乙醇回流 2 次,时间分别为 1、0.5 h,滤过,减压浓缩。药渣再分别用 10 倍量水煎煮 2 次,时间分别为 1、0.5 h,滤过,浓缩,与醇提浓缩液合并,分别制成含生药 1.0 g/mL 的药液。

**2.2.2 止泻实验** 选取体质量 18~22 g 小鼠,雌雄各半,随即分为 7 组,每组 10 只。根据预试验结果,车前子不同炮制品按 0.2 mL/10 g ig,连续给药 7 d,模型组、空白组给予等体积生理盐水,阳性组给予颠茄磺苄啉混悬液(0.05 g/mL),其余各组每天 1 次 ig 生品、炒品、盐品、酒品提取液(0.2 mL/10 g),在第 6 天晚禁食不禁水过夜,第 7 天末次给药 0.5 h 后,除空白组外均 ig 蓖麻油 0.2 mL/10 g,造成小鼠腹泻模型,0.5 h 后开始计时,实验 1~5 h 内每小时换滤纸 1 次,观察、记录并计算腹泻指数[腹泻指数=稀便率 $\times$ 稀便级,其中稀便率为 1 组小鼠中排稀便的小鼠数与该组小鼠总数的百分比;稀便级:以稀便污染滤纸形成污迹面积的大小定级,分为 4 级,标准:级数(污染直径 cm):1(<1 cm)、2(1~1.9 cm)、3(2~3 cm)、4(>3 cm)]。

**2.2.3 实验结果** 数据采用 SPSS 13.0 软件统计分析,比较各组差异性,结果见表 1。可知,阳性组和车前子不同炮制品组各个时间段与模型组比较都有显著性差异( $P<0.01$ ),说明车前子不同炮制品(生品除外)对蓖麻油所致小鼠腹泻具有一定的抑制作用,而生品则进一步加重小鼠腹泻;盐炙品、酒品与炒品各个时间段比较也有显著差异( $P<0.01$ ),盐炙品和酒品在第 2、4 小时没有任何差异( $P>0.05$ ),说明了车前子在炮制前后功效有一定变化,对蓖麻油所致小鼠腹泻,炒品、盐品、酒品均有止泻作用,而炒车前子的止泻作用最好,作用强弱依次为炒品 $>$ 酒品 $\geq$ 盐品。

### 2.3 HPLC 法测定京尼平苷酸和毛蕊花糖苷<sup>[10]</sup>

**2.3.1 色谱条件** 色谱柱为 Diamonsil(钻石) C<sub>18</sub> 柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5  $\mu$ m);流动相为甲醇-0.5%乙酸水溶液,梯度洗脱:0~1 min, 5%甲醇;1~40 min, 5%~60%甲醇;40~50 min, 5%甲醇;体

表 1 车前子不同炮制品对蓖麻油所致小鼠腹泻的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

Table 1 Antidiarrheal effects of different processed products on diarrhea mouse model induced by castor oil ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

| 组别    | 腹泻指数                         |                              |                              |                              |                              |
|-------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
|       | 1 h                          | 2 h                          | 3 h                          | 4 h                          | 5 h                          |
| 空白    | 0                            | 0                            | 0                            | 0                            | 0                            |
| 模型    | 132.78±14.91                 | 245.68±12.41                 | 346.50±9.44                  | 294.54±15.20                 | 217.59±11.68                 |
| 阳性对照  | 1.81±0.16 <sup>**△△</sup>    | 11.26±0.43 <sup>**△△</sup>   | 61.93±3.68 <sup>**△△</sup>   | 41.35±3.71 <sup>**△△</sup>   | 6.47±2.16 <sup>**△△</sup>    |
| 车前子炒品 | 12.78±3.63 <sup>**</sup>     | 37.03±5.42 <sup>**</sup>     | 86.22±8.16 <sup>**</sup>     | 58.93±5.42 <sup>**</sup>     | 34.44±5.03 <sup>**</sup>     |
| 车前子盐品 | 41.42±5.89 <sup>**△△</sup>   | 200.16±11.75 <sup>**△△</sup> | 240.17±10.67 <sup>**△△</sup> | 157.90±11.35 <sup>**△△</sup> | 104.76±5.89 <sup>**△△</sup>  |
| 车前子酒品 | 39.71±4.50 <sup>**△△</sup>   | 130.07±8.22 <sup>**△△</sup>  | 208.11±7.51 <sup>**△△</sup>  | 156.25±7.44 <sup>**△△</sup>  | 115.76±7.22 <sup>**△△</sup>  |
| 车前子生品 | 145.64±15.05 <sup>**△△</sup> | 285.39±15.11 <sup>**△△</sup> | 386.50±4.74 <sup>**△△</sup>  | 328.48±15.70 <sup>**△△</sup> | 277.08±17.28 <sup>**△△</sup> |

与模型组比较: <sup>\*\*</sup> $P<0.01$ ; 与炒品组比较: <sup>△△</sup> $P<0.01$

<sup>\*\*</sup> $P<0.01$  vs model group; <sup>△△</sup> $P<0.01$  vs fried product group

积流量 1 mL/min; 检测波长 254 nm; 柱温 25 °C; 检测时间 50 min。

**2.3.2 对照品溶液的制备** 取京尼平苷酸、毛蕊花糖苷对照品适量,精密称定,置棕色量瓶中,加 60% 甲醇制成含京尼平苷酸 0.100 mg/mL、毛蕊花糖苷 0.113 mg/mL 的混合对照品溶液,即得。

**2.3.3 供试品溶液的制备** 分别称取以上 4 种炮制品粉末(过 2 号筛)1 g,置圆底烧瓶中,加入 60% 甲醇 50 mL,称定质量,加热回流 2 h,放冷,再称定质量,用 60% 甲醇补足减少的质量,摇匀,滤过,即得。

**2.3.4 线性范围考察** 精密吸取已配好的混合对照品溶液 2、4、8、12、16、20、24、28 μL 进样,分别以京尼平苷酸和毛蕊花糖苷的峰面积积分值( $Y$ )对进样量( $X$ )进行回归处理,得京尼平苷酸回归方程  $Y=10.518 X-0.572 7$ ,  $r=0.999 7$ ,毛蕊花糖苷回归方程  $Y=22.133 X-0.175 7$ ,  $r=0.999 8$ ,京尼平苷酸在 0.2~2.4 μg 呈良好的线性关系,毛蕊花糖苷在 0.226~3.164 μg 呈良好的线性关系。

**2.3.5 精密度考察** 取混合对照品溶液(京尼平苷酸 0.1 mg/mL、毛蕊花糖苷 0.113 mg/mL),连续进样 6 次,每次 10 μL,按照上述色谱条件测定峰面积,计算精密度,京尼平苷酸和毛蕊花糖苷的 RSD 分别为 0.651%、0.722%,表明仪器精密度良好。

**2.3.6 重复性考察** 取同一批号炒车前子样品溶液 6 份,按上述样品制备方法和色谱条件,测定峰面积,计算得京尼平苷酸和毛蕊花糖苷质量分数的 RSD 分别为 0.953%、0.816%,表明该方法重复性良好。

**2.3.7 稳定性考察** 取同一批号炒车前子样品溶

液,分别于 0、1、2、4、8、12、24 h 按照上述色谱条件测定峰面积,考察稳定性。京尼平苷酸和毛蕊花糖苷峰面积的 RSD 分别为 1.052%、0.732%,表明样品溶液在 24 h 内稳定性良好。

**2.3.8 加样回收率考察** 分别精密称取同一批已测定的样品 9 份,分别加入适量对照品。按“2.3.3”项的方法制成新的供试品溶液,测定其峰面积,计算加样回收率,得京尼平苷酸的加样回收率为 103%,RSD 为 1.83%;毛蕊花糖苷的加样回收率为 98%,RSD 为 2.67%,表明方法准确度良好。

## 2.4 醇、水浸出物的测定

参照《中国药典》2010 年版一部附录 XA 项下热浸法进行测定。

## 2.5 车前子炒制工艺的单因素试验

根据文献资料及预试验考察结果,选用车前子的有效成分京尼平苷酸、毛蕊花糖苷、水浸出物、醇浸出物的量作为评价指标,考察炮制温度(A)、炮制时间(B)对炒车前子的影响,从而确定这两个因素对炒车前子质量影响的水平范围。

**2.5.1 炒制温度的考察** 称取净车前子 100 g,控制锅底温度 150、200、250 °C,炒制 5 min,结果京尼平苷酸分别为 0.725%、1.153%、1.142%,毛蕊花糖苷分别为 0.236%、0.336%、0.221%,水浸出物分别为 9.318%、12.318%、11.630%,醇浸出物分别为 4.207%、5.374%、4.327%。可知,随着温度的增高,车前子 4 个指标的量均呈现先升后降的趋势,在 200 °C 左右最好。

**2.5.2 炒制时间的考察** 称取净车前子 100 g,锅底温度 200 °C,炒制 3、4、5、6 min,结果京尼平苷酸分别为 0.817%、1.083%、1.166%、1.103%,毛

蕊花糖苷分别为 0.195%、0.289%、0.337%、0.321%，水浸出物分别为 9.458%、11.573%、12.432%、12.518%，醇浸出物分别为 3.506%、4.894%、5.408%、5.172%。可知，车前子 4 个指标的量均在 5 min 左右最好，只有水浸出物的量在 6 min 时要多于 5 min，但差异不明显。

## 2.6 CCD-RSM 优选车前子炒制工艺

**2.6.1 试验设计及结果** 在前期单因素试验的基础上，选取对车前子炒制工艺影响较显著的 2 个因素设为星点设计的自变量，采用 Dseign-Expert 8.0.7.1 软件对这 2 个因素分别在 5 个水平上进行设计，以

京尼平苷酸量 ( $Y_1$ )、毛蕊花糖苷量 ( $Y_2$ )、水浸出物量 ( $Y_3$ )、醇浸出物量 ( $Y_4$ )、综合评分 (OD) 值作为响应值，共设计 13 组试验对方程中各项回归系数进行回归拟合。为减小误差，其中取 5 组中心点，析因部分试验为 8 组，因素水平及试验结果见表 2。OD 值采用 Hassan 方法计算<sup>[11-12]</sup>。其中  $Y_1$ 、 $Y_2$  为《中国药典》2010 年版规定车前子所测的主要有效成分，故权重系数均设为 0.4；而中药的药效是多成分协同作用的结果，故增加了  $Y_3$ 、 $Y_4$  的测定，但权重系数仅均设为 0.1。

**2.6.2 模型拟合** 采用 Dseign-Expert 8.0.7.1 软件，

表 2 CCD-RSM 试验设计及结果  
Table 2 CCD-RSM test design and results

| 试验号 | A / °C          | B / min       | $Y_1$ / % | $Y_2$ / % | $Y_3$ / % | $Y_4$ / % | OD 值  |
|-----|-----------------|---------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-------|
| 1   | 210 (0)         | 4.5 (0)       | 1.145     | 0.309     | 12.313    | 5.315     | 0.903 |
| 2   | 170 (-1)        | 3.0 (-1)      | 0.562     | 0.119     | 8.234     | 2.601     | 0.423 |
| 3   | 210 (0)         | 4.5 (0)       | 1.096     | 0.297     | 11.974    | 4.729     | 0.861 |
| 4   | 170 (-1)        | 6.0 (1)       | 0.892     | 0.322     | 10.958    | 4.538     | 0.814 |
| 5   | 210 (0)         | 4.5 (0)       | 1.241     | 0.308     | 11.635    | 5.792     | 0.936 |
| 6   | 210 (0)         | 4.5 (0)       | 1.177     | 0.316     | 12.192    | 5.201     | 0.918 |
| 7   | 210 (0)         | 6.62 (1.414)  | 1.029     | 0.271     | 12.157    | 4.526     | 0.808 |
| 8   | 153.43 (-1.414) | 4.5 (0)       | 0.613     | 0.191     | 8.694     | 3.830     | 0.546 |
| 9   | 250 (1)         | 3.0 (-1)      | 0.800     | 0.122     | 8.613     | 3.506     | 0.520 |
| 10  | 210 (0)         | 4.5 (0)       | 1.257     | 0.35      | 13.114    | 5.479     | 0.995 |
| 11  | 250 (1)         | 6.0 (1)       | 0.965     | 0.143     | 11.792    | 3.294     | 0.617 |
| 12  | 210 (0)         | 2.38 (-1.414) | 0.568     | 0.135     | 7.573     | 2.112     | 0.429 |
| 13  | 266.57 (1.414)  | 4.5 (0)       | 0.991     | 0.137     | 9.319     | 3.037     | 0.595 |

以  $Y_1$ 、 $Y_2$ 、 $Y_3$ 、 $Y_4$ 、OD 值对各因素进行二次多项式模型拟合，并通过相关系数和方差分析对拟合模型进行评价。通过对表 2 中实验数据进行回归分析，得回归模型。比较各拟合方程的拟合度，确定其拟合方式，得到 5 个回归方程<sup>[13]</sup>： $Y_1=1.18+0.11A+0.14B-0.041AB-0.19A^2-0.19B^2$  ( $R^2=0.9629$ ,  $P<0.0001$ ,  $F=36.29$ , 失拟度=0.6002 $>0.05$ ,  $F=0.70$ )； $Y_2=0.32-0.032A+0.052B-0.046AB-0.078A^2-0.058B^2$  ( $R^2=0.9689$ ,  $P<0.0001$ ,  $F=43.59$ , 失拟度=0.4173 $>0.05$ ,  $F=0.12$ )； $Y_3=12.25+0.26A+1.55B+0.11AB-1.5A^2-1.07B^2$  ( $R^2=0.9603$ ,  $P<0.0001$ ,  $F=33.87$ , 失拟度=0.6825 $>0.05$ ,  $F=0.54$ )； $Y_4=5.30-0.18A+0.64B-0.54AB-0.91A^2-0.96B^2$  ( $R^2=0.9357$ ,  $P<0.0005$ ,  $F=20.38$ , 失拟度=0.4797 $>0.05$ ,  $F=$

1.00)； $OD=0.92-0.00384A+0.13B-0.074AB-0.18A^2-0.15B^2$  ( $R^2=0.9731$ ,  $P<0.0001$ ,  $F=50.56$ , 失拟度=0.6818 $>0.05$ ,  $F=0.54$ )。

由拟合结果可知，模型  $F$  值均较高， $P<0.01$ ，说明 5 个模型高度显著；失拟项  $F$  值较小， $P>0.05$ ，失拟项不具有显著性，说明 5 个模型在各自的回归区域拟合良好，符合实验要求，可用拟合的 5 个回归模型分别对实验结果进行统计分析。5 个模型的信噪比很高(分别为 15.829、14.142、13.105、10.821、17.643)，即该模型可用于预测；方程的决定系数  $R^2>0.95$ ，表明实测值与模型预测值间有高度的相关性，能准确地预测实际情况；其校正决定系数  $R_{adj}^2$  分别为 0.9363、0.9467、0.9320、0.8898、0.9538，表明模型响应值的变化有较高机率来源于所选自变量，该实验误差较小，较好地描述各因素与响应值

之间的真实关系, 因此可以用模型对车前子炒制工艺进行分析与预测。

### 2.6.3 工艺参数预测和优化 由模型所拟合得到的

多项式方程, 应用 Dseign-Expert 8.0.7.1 软件分别绘制 5 个响应值与自变量的三维效应面图和等高线图 (图 1), 预测车前子炒制最佳工艺条件。Y<sub>1</sub>: A 和 B

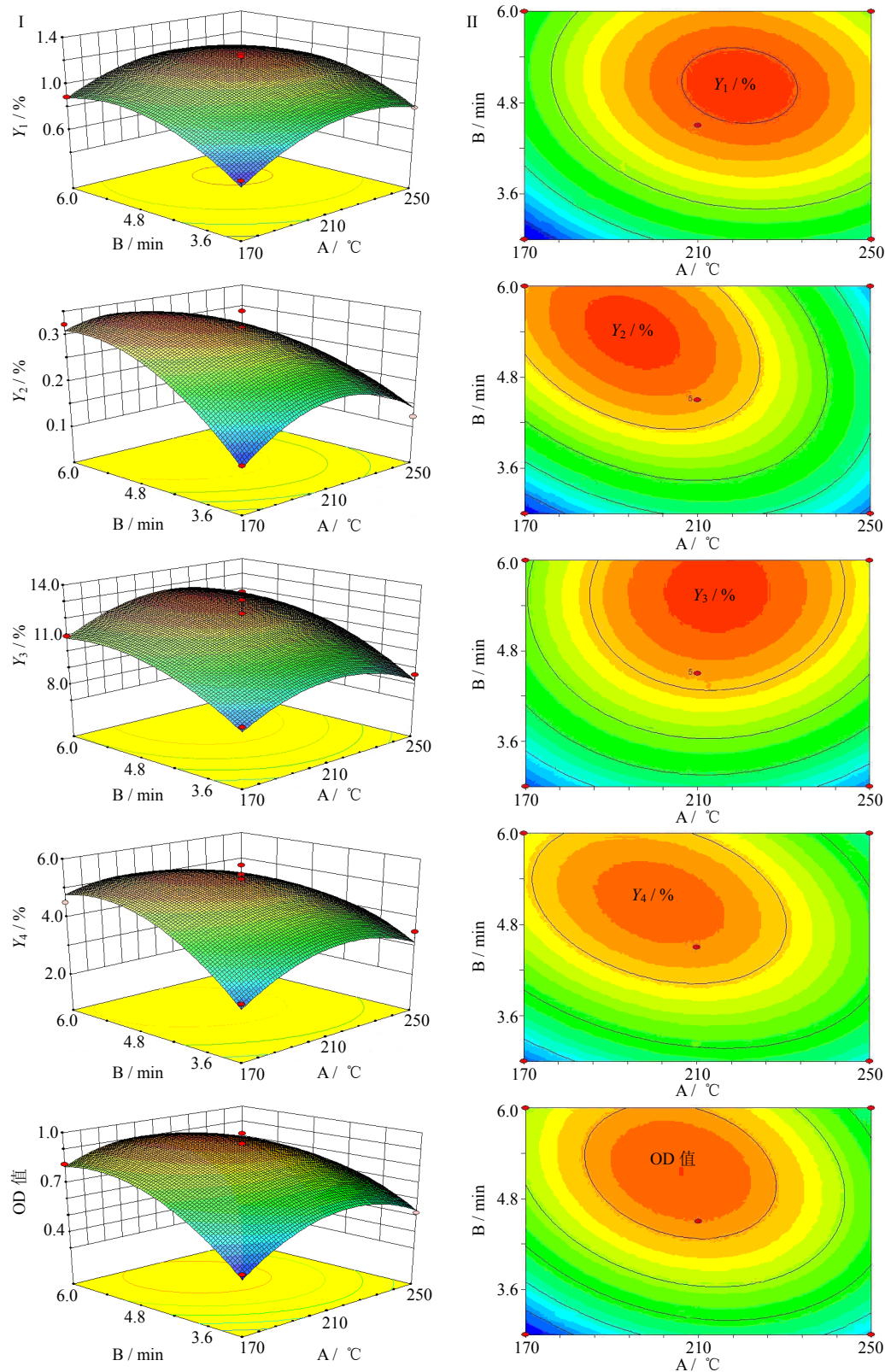


图 1 Y<sub>1</sub>、Y<sub>2</sub>、Y<sub>3</sub>、Y<sub>4</sub>、OD 值与 A、B 因素的三维效应面图 (I) 和等高线图 (II)

Fig. 1 3D-Response surface (I) and contour figure (II) as effect of A and B on Y<sub>1</sub>, Y<sub>2</sub>, Y<sub>3</sub>, Y<sub>4</sub>, and OD

对京尼平苷酸量有明显影响,在A为219.64℃和B为5.02 min时有利于提高其量; $Y_2$ : A、B、交互项AB对毛蕊花糖苷量有明显影响,在A为194.91℃和B为5.39 min时有利于提高其量; $Y_3$ : B对水浸出物量有明显影响,在A为214.58℃和B为5.59 min时有利于增加其量; $Y_4$ : B、交互项AB对醇浸出物量有明显影响,在A为201.34℃和B为5.09 min或A为201.04℃和B为5.10 min时有利于增加其量,但两者差异很小;OD值: B、交互项AB对OD值有明显影响,在A为206.81℃和B为5.19 min时有利于提高OD值。

由图1可知,随着炮制温度的增加,京尼平苷酸量、毛蕊花糖苷量、水浸出物量、醇浸出物量均呈现先升后降的趋势,这可能是由于高温有利于车前子种壳破裂,促使有利于有效成分的溶出,但升高温度对毛蕊花糖苷量、醇浸出物量的影响要大于京尼平苷酸量和水浸出物量,毛蕊花糖苷在195℃、醇浸出物在201℃以上其量就呈下降趋势,而京尼平苷酸和水浸出物要214℃以上才呈下降趋势,从而可看出京尼平苷酸和水浸出物要比毛蕊花糖苷和醇浸出物在高温下更稳定。B对5个响应值的影响均最为显著,随着炒制时间的增加,京尼平苷酸量、毛蕊花糖苷量、水浸出物量、醇浸出物量也均呈现先升后降的趋势,炒制时间对4个成分量的影响相差不大,都在5 min多,在实际操作中也发现,在高温下炒制超过6 min,容易出现焦糊。

由于中药是多成分的综合作用,故最终以OD值对最佳工艺进行预测,优选2个因素的工艺参数。由图1可知对OD值影响显著的是一次项B,交互项AB和二次项 $A^2$ 、 $B^2$ ,说明各因素与响应值之间并不是简单的线性关系;B对OD值影响极为显著( $P<0.01$ )、AB对OD值的影响显著( $P<0.05$ ),炮制温度与炮制时间对OD值有较强的交互作用。考虑到实验的可操作,对各因素取整数,因此得到综合的最佳炒制工艺:取净车前子,在210℃炒制5 min。

**2.6.4 验证试验** 通过验证试验,检查拟合模型与试验结果是否相符。将以上因素结果代入方程得到各指标成分的预测值 $Y_1$ 为1.210%、 $Y_2$ 为0.327%、 $Y_3$ 为12.642%、 $Y_4$ 为5.410%,按照上述条件重复3次试验,实测平均值结果为 $Y_1$ 为1.219%、 $Y_2$ 为0.323%、 $Y_3$ 为12.426%、 $Y_4$ 为5.370%,RSD分别为1.28%、1.81%、2.60%、2.16%,预测值与实测

值接近,偏差低于3%,说明所建立的模型预测性好,该工艺稳定可行,具有实际应用价值。故确定车前子最佳炒制工艺为炒制温度为210℃,炮制时间5 min。

### 3 讨论

车前子的炮制历史悠久,汉代《华氏中藏经》首次记载了“炒”法,其后不断出现车前子新的炮制方法,以生品、炒品、酒炙品、盐炙品为主。本实验关于车前子不同炮制品对蓖麻油所致小鼠腹泻的研究中发现,各种炮制品抑制作用差异较大,其中以炒品止泻作用最显著,作用强弱依次为炒品>酒品≥盐品,而生品具有一定的润肠通便的作用,可能因为车前子生品中比其他炮制品含有更多不被消化吸收的多聚糖、黏液质,从而具有明显的致泻作用<sup>[14-15]</sup>。在实验中也发现,车前子经过炒制后,黏液质明显减少。蓖麻油是作用于小鼠小肠端所致腹泻,从而推测车前子炮制品的止泻作用发挥部位也可能在小肠,同时因蓖麻油也具有“润肠通便”的功效,揭示了车前子炮制后(生品除外)有“实肠止泻”的作用<sup>[7]</sup>。在前期车前子指纹图谱的实验中发现,车前子不同炮制品的化学成分发生了质和量的改变,生品有6个峰,酒品只有5个峰,而盐制品有9个峰,炒品有13个峰,在其共有峰中生品只有1个峰的峰面积(1号峰)远远大于其余3个炮制品,而这个峰在炒品中的峰面积最小,面积差异大。但车前子中的1号峰具体是什么成分,止泻作用是否于此成分的量减少有关,还有待进一步证明。

小鼠腹泻模型中大多采用稀便率来判断药物是否具有止泻效果,这只能从小鼠腹泻的数量来反映是否有效、不能从稀便的质地反映腹泻情况,故本实验在车前子不同炮制品对小鼠腹泻的研究中,采用腹泻率、腹泻指数判断小鼠是否造模成功,用腹泻指数进行统计分析判断药物是否有止泻作用,这样不仅考虑了稀便量的变化,又考虑到稀便质的变化,比单用稀便率和稀便级这2个指标更全面更客观,更有可比性。《中国药典》2010年版对车前子的质量控制,采用HPLC测定京尼平苷酸、毛蕊花糖苷的量。在车前子炒制工艺研究中,考虑到中药的作用是多成分、多靶点协同作用的结果,因此增加了水浸出物和醇浸出物的测定,这样更能从多角度对车前子的质量进行整体全面地掌控,也为后续车前子制剂的研究提供基础。除此之外,还对桃叶

珊瑚苷进行测定,但桃叶珊瑚苷不是很稳定,在同一色谱条件下不能进行很好地分离重现,而桃叶珊瑚苷和京尼平苷酸同属于环烯醚萜苷类化合物,故实验中只以京尼平苷酸、毛蕊花糖苷、水浸出物和醇浸出物为指标,并采取综合评分对车前子炒制工艺进行规范化研究。

目前,车前子炒制工艺均较混乱,对影响车前子炒制的重要因素,没有具体的工艺参数,以及炮制前后药物的变化缺乏相对统一和系统的认识,导致中药在使用过程中的一些不确定性和盲目性,最终导致临床药效存在巨大差异。在炮制工艺研究中常常采用正交试验或均匀设计来筛选最佳工艺,但这2种方法是基于线性模型数据处理的设计,试验次数较少,没有充分考虑实验的随机误差,只能对孤立的实验点进行分析,忽略了各因素交互作用的影响,与真实值存在一定偏离。响应面优化法,集数学和统计学方法于一体,方法设计、计算比较简便,可以解决非线性模型的设计,所得的预测模型是连续的,可以预测响应最优值以及相应的工艺参数,试验精度高、可信度好。本实验对所得数据采取线性模型、二项式方程、三项式方程的模型拟合,线性模型 $R^2$ 偏低,三项式与二项式方程相差不大,故最终筛选出二项式拟合模式,使所得最佳炒制工艺更合理可行,预测性好。综上,本研究为车前子炮制工艺和质量标准奠定一定的基础,为其他相关炮制工艺的规范化研究提供参考,进一步对车前子不同炮制品在临床上的合理使用提供依据。

#### 参考文献

- [1] 魏·吴普. 神农本草经 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1963.
- [2] 龚千峰. 中药炮制学 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2013.
- [3] 李 果, 张的凤, 王文凯, 等. 车前子炮制历史沿革 [J]. 中药材, 2008, 31(5): 776.
- [4] 刘川玉, 周劲刚, 何 洁, 等. 车前子不同炮制品对慢性功能性便秘的疗效 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(16): 259-261.
- [5] 宋艳丽, 韩腾飞, 李莎莎, 等. 栀子苷经鼻给药醇质体喷雾剂的制备及其体外鼻黏膜渗透性研究 [J]. 中草药, 2013, 44(9): 1105-1110.
- [6] 肖婷婷, 郭 倩, 田成旺, 等. 星点设计-效应面法优化五参分散片的处方研究 [J]. 现代药物与临床, 2013, 28(6): 861-865.
- [7] 冉懋雄, 郭建民. 现代中药炮制手册 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2002.
- [8] 瞿 燕. 川木香煨制前后药效成分变化与药理作用机理相关性研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2010.
- [9] 魏 伟, 吴希美, 李元建. 药理实验法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2010.
- [10] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [11] 吴 伟, 崔光华, 陆 彬. 实验设计中多指标的优化: 星点设计和总评“归一值”的应用 [J]. 中国药理学杂志, 2000, 35(8): 530-533.
- [12] Abu-Izza K A, Garcia-Contreras L, Lu D R. Preparation and evaluation of zidovudine-loaded sustained release microspheres optimization of multiple response variables [J]. *J Pharm Sci*, 1996, 85(6): 572-576.
- [13] 吴 伟, 崔光华. 星点设计-效应面优化法及其在药学中的应用 [J]. 国外医学, 2000, 27(5): 292-298.
- [14] 唐建红, 刘川玉, 苏 涵. 车前子不同炮制品多糖含量的测定 [J]. 华夏医学, 2009, 22(3): 494-496.
- [15] 吴光杰, 田颖刚, 谢明勇, 等. 车前子多糖对便秘模型小鼠通便作用的研究 [J]. 食品科学, 2007, 28(10): 514-516.