

响应面法优化秦皮产地加工与饮片炮制一体化工艺研究

赵重博, 王 晶, 吴建华, 邹俊波, 李晓尧, 史亚军, 王昌利*

陕西中医药大学药学院, 陕西 咸阳 712046

摘要:目的 应用星点设计-响应面法优化秦皮产地加工与饮片炮制一体化工艺。方法 以 HPLC 法和紫外分光光度法测得秦皮中秦皮甲素、秦皮乙素、秦皮素、秦皮苷和总香豆素含量的总评归一值 (Y) 为评价指标, 以切制规格 (X_1)、干燥温度 (X_2) 和干燥时间 (X_3) 为考察对象, 利用星点设计效应面法优化秦皮的产地加工与饮片一体化工艺; 并研究一体化秦皮饮片的抗炎镇痛效果。结果 最佳一体化工艺为秦皮药材去粗皮后, 切 6 mm 厚的丝, 75 °C 干燥 3.25 h; 该工艺生产的秦皮饮片可显著减少冰醋酸致小鼠的扭体反应次数, 延长潜伏期, 抑制角叉菜胶诱导的大鼠足肿胀反应, 明显或部分缓解肿胀程度; 一体化秦皮饮片比传统饮片镇痛作用更加明显, 差异显著 ($P < 0.05$)。结论 响应面法优选秦皮产地加工一体化工艺简便易行, 准确度较好, 为其他皮类饮片生产提供参考, 具有一定的推广应用价值。

关键词: 秦皮; 炮制一体化; 星点设计; 香豆素; 总评归一值

中图分类号: R283.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)20-4753-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.20.007

Optimization of integrative technology of primary processing for *Fraxini Cortex* based on response surface methodology

ZHAO Chong-bo, WANG Jing, WU Jian-hua, ZOU Jun-bo, LI Xiao-yao, SHI Ya-jun, WANG Chang-li

Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712046, China

Abstract: Objective To optimize the processing integration technology of *Fraxini Cortex* based on response surface methodology. **Methods** The single factor experiment combined with Box-Behnken design was used to optimize the integrative technology, with five major characteristic components (aesculin, aesculetin, fraxetin, fraxin, and total coumarin) as indexes, in order to detect three factors (cutting thickness, drying temperature, and drying time), and research the effect of analgesic and anti-inflammatory of processing integration *Fraxini Cortex*. **Results** Optimum integrative technology of primary processing was as follows: cutting 6 mm *Fraxini Cortex*, and drying for 3.25 h at 75 °C. The processing integration *Fraxini Cortex* significantly decreased the times of wrinkle reaction induced by acetic acid in mice, prolonged the latent period, and obviously or partially inhibited the feet swelling degree induced by carrageenan in rats. The analgesic effect of integrated technology group was more obvious than traditional technology group ($P < 0.05$). **Conclusion** This optimized integrative technology of *Fraxini Cortex* is reasonable and feasible with high accuracy. It could provide the scientific basis and innovative idea to the large-scale production of decoction pieces of Chinese materia medica and have the certain value for its promotion and application.

Key words: *Fraxini Cortex*; processing integration; central composite design; coumarin; overall desirability

秦皮为木犀科植物苦枥白蜡树 *Fraxinus rhynchophylla* Hance、白蜡树 *F. chinensis* Roxb.、尖叶白蜡树 *F. szaboana* Lingelsh. 或宿柱白蜡树 *F. stylosa* Lingelsh. 的干燥枝皮或干皮, 主产于陕西, 春秋 2 季采收^[1], 尤以 3~4 年生的干皮药材质量为

好。秦皮为清热燥湿药, 传统用于治疗湿热泻痢、目赤肿痛等症, 其主要成分为香豆素类化合物, 如秦皮甲素、秦皮乙素、秦皮苷、秦皮素等, 具有抗菌、抗炎、保肝等作用^[2-6]。

秦皮饮片的传统炮制方法为除去杂质, 洗净,

收稿日期: 2018-02-09

基金项目: 国家中医药管理局中医药行业科研专项 (201507002)

作者简介: 赵重博 (1987—), 男, 博士, 讲师, 研究方向为中药炮制与饮片质量标准。E-mail: 549536693@qq.com

*通信作者 王昌利, 教授, 硕士生导师, 研究方向为中药新剂型与新技术研究、中药材产地加工与炮制一体化研究。

E-mail: wcl3433@163.com

润透,切丝,干燥(《中国药典》2015年版)。而目前市场上的秦皮饮片多存在不去粗皮或粗皮去不净的现象,严重影响秦皮的临床疗效和调剂时的剂量准确性。这是因为皮类药材市场上多以面积大小来评价药材等级^[7],由于秦皮药材价格便宜,且采收费时费力,导致药农在采收时只采生长年限长(尤其5年以上^[8])的树皮,虽然这些树皮面积大,但是纤维性很强、栓皮部位很厚。这样的树皮在饮片厂即使反复闷润也很难刮去粗皮,因此很多饮片厂生产的秦皮不去粗皮,这样不仅难以保证有效部位的含量,且干燥后秦皮丝经常出现韧皮部与栓皮部分离的现象,既不美观,也容易掉渣。且秦皮药材长时间反复闷润,由于秦皮甲素等香豆素类成分可溶于水,容易导致此类有效成分的流失。

为提高秦皮药材中有效成分的利用率,便于去除粗皮,可将秦皮的产地加工与炮制生产工艺进行整合,以采收后产地直接趁鲜刮去粗皮、切制干燥的方法制备秦皮产地加工与炮制生产一体化饮片。已有学者对秦皮进行了产地加工与饮片炮制一体化技术研究^[9],但文章报道的一体化工艺秦皮饮片是在老药工的经验指导下生产的,且只报道了化学成分的变化,没有对其药理作用进行研究。因此本研究以秦皮甲素、秦皮乙素、秦皮素、秦皮苷和总香豆素含量的总评归一值为评价指标,采用星点设计-效应面法^[10-12]优选秦皮产地加工与炮制一体化工艺;在此基础上研究秦皮的抗炎镇痛作用。以期为秦皮的一体化生产提供科学依据。

1 材料

1.1 仪器

UltiMate™3000 型反相高效液相色谱仪,配 LPG3400A 低压四元梯度泵、PDA3000 二极管阵列检测器、Chromeleon 工作站、U3000 TCC-3000SD 标准柱温箱,美国戴安公司;AR1140 型电子天平,万分之一,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;DZF-6050 真空干燥箱,上海欣齐科学仪器有限公司;KH-400-KDE 型高功率数控超声波清洗器,昆山禾创超声仪器有限公司;QE-300 g 粉碎机,浙江屹立工贸有限公司;iMark 酶标仪 18485,美国 Bio-Rad 公司;PV-200 足肿胀测定仪,成都泰盟科技有限公司。

1.2 动物

SPF 级雄性 KM 小鼠,体质量 18~22 g;SPF 级雄性 SD 大鼠,体质量 150~180 g,购自西安交

通大学医学部实验动物中心,动物合格证号 SCXK(陕)2012-003。

1.3 试药

秦皮药材于 2017 年 7 月采自陕西省宝鸡市,由陕西中医药大学药学院王昌利教授鉴定为木犀科植物宿柱白蜡树 *Fraxinus stylosa* Lingelsh. 的干燥干皮,凭证标本(YP-308)保存于陕西中医药大学炮制教研室。对照品秦皮甲素(批号 110740-200104)、秦皮乙素(批号 110741-200607)、秦皮素(批号 111731-200501)购于中国食品药品检定研究院,对照品秦皮苷(批号 20140513)购自西玛实验室,HPLC 测定各对照品质量分数均≥98%;戊巴比妥钠,中国医药(集团)上海化学试剂公司,批号 F20090417;甲醇、磷酸、冰醋酸均为分析纯,成都市科龙化工有限公司;乙腈为色谱纯,赛默飞世尔中国有限公司;水为娃哈哈纯净水;λ 型角叉菜胶,美国 Sigma 公司,批号 22049-5G-F。

2 方法与结果

2.1 总香豆素含量测定^[13-15]

2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取秦皮甲素对照品,置于 10 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得质量浓度为 0.33 mg/mL 的对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液的制备 称取秦皮药材粉末 1 g(过 3 号筛),精密称定,置具塞圆底烧瓶中,再精密加入 50 mL 甲醇,称定质量,加热回流 1 h,放冷,用甲醇补足减失质量,摇匀,滤过,即得。

2.1.3 最大吸收波长的确定 以甲醇溶液作为空白对照,分别将上述对照品和样品溶液在紫外分光光度计进行全波长扫描,结果对照品和样品均在 334 nm 处有最大吸收,故选择检测波长 334 nm。

2.1.4 线性关系考察 精密量取“2.1.1”项下秦皮甲素对照品溶液 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL,分别置于 10 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,以甲醇为空白,在 334 nm 波长处测定吸光度(*A*),以 *A* 值为纵坐标,秦皮甲素的质量浓度(*C*)为横坐标,绘制标准曲线,得回归方程 $A=0.099\ 3\ C+0.149\ 5$, $r=0.999\ 7$,表明秦皮甲素在 6.6~33.0 μg/mL 线性关系良好。

2.1.5 精密度试验 取同一对照品溶液,以甲醇为空白对照,在 334 nm 波长处测定 *A* 值,重复测定 6 次,RSD 为 0.42%,表明本方法精密度良好。

2.1.6 稳定性试验 取同一供试品溶液,以甲醇为空白对照,分别在 0、2、4、6、8 h 时间点,在 334

nm 波长处测定 A 值, RSD 为 1.21%, 结果表明供试品溶液在 8 h 内基本稳定。

2.1.7 重复性试验 取同一样品 6 份, 每份 1 g, 按照“2.1.2”项下方法制备供试品溶液, 以甲醇为空白对照, 在 334 nm 波长处测定 A 值, RSD 为 1.36%, 表明本方法重复性良好。

2.1.8 加样回收率试验 取已测定总香豆素含量的样品 6 份, 每份 0.5 g, 分别加入一定量秦皮甲素对照品溶液, 按照“2.1.2”项下方法制备供试品溶液, 以甲醇为空白对照, 在 334 nm 波长处测定 A 值, 结果平均回收率为 97.42%, RSD 为 2.16%, 结果表明本方法回收率良好。

2.2 4 种主要香豆素含量测定^[16]

2.2.1 色谱条件 色谱柱为 Betasil C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-0.1%磷酸水溶液 (12:88); 检测波长 334 nm; 柱温 30 ℃; 体积流量 1 mL/min; 进样量 10 μL。理论塔板数按秦皮乙素峰计算应不低于 5 000。

2.2.2 对照品溶液的制备 分别精密称取秦皮甲素、秦皮乙素、秦皮素、秦皮苷对照品适量, 加甲醇溶解并配制成含秦皮甲素 0.33 mg/mL、秦皮苷 0.13 mg/mL、秦皮乙素 0.21 mg/mL、秦皮素 0.16 mg/mL 的混合对照品溶液, 混匀备用。

2.2.3 供试品溶液的制备 取秦皮样品粉末约 0.5 g (过 3 号筛), 精密称定, 置具塞圆底烧瓶中, 再精密加入 50 mL 甲醇, 密塞, 称定总质量, 加热回流 1 h, 放冷, 再称定总质量, 用甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液过 0.45 μm 微孔滤膜, 即得。

2.2.4 专属性考察 按“2.2.1”项下色谱条件测定空白甲醇溶液、混合对照品溶液和供试品溶液, 色谱图见图 1, 结果显示, 各组分离度好, 无干扰。

2.2.5 线性关系的考察 按“2.2.1”项下色谱条件进行, 测定进样量分别为 5、8、11、14、17、20 μL 的混合对照品溶液中 4 个香豆素峰面积, 以进样量为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y), 建立标准曲线, 计算回归方程, 分别为秦皮甲素 $Y=52.141 X+1.387 2$, $r=0.999$, 在 1.65~6.6 μg 与峰面积呈良好的线性关系; 秦皮苷 $Y=44.784 X+0.245 1$, $r=0.999$, 在 0.65~2.6 μg 与峰面积呈良好的线性关系; 秦皮乙素 $Y=37.298 1 X-3.157 8$, $r=0.999$, 在 1.05~4.2 μg 与峰面积呈良好的线性关系; 秦皮素 $Y=16.563 X+0.125 2$, $r=0.999$, 在 0.9~3.2 μg 与

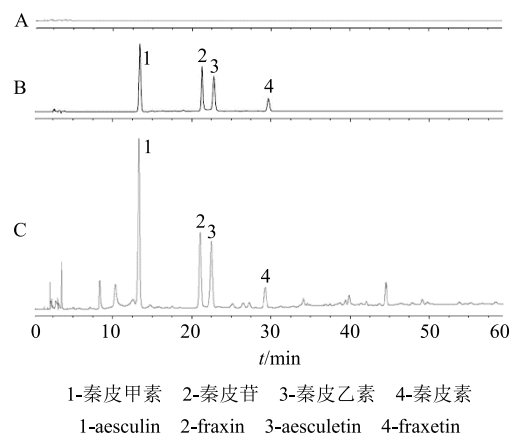


图 1 空白甲醇 (A)、混合对照品 (B) 和秦皮甲醇提取物 (C) 的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC spectrogram of blank methanol (A), mixed reference substance (B), and methanol extract of *Fraxini Cortex* (C)

峰面积呈良好的线性关系。

2.2.6 精密度试验 按“2.2.1”项下色谱条件, 连续进样测定混合对照品 6 次, 记录峰面积, 计算秦皮甲素、秦皮苷、秦皮乙素、秦皮素峰面积 RSD 分别为 0.21%、0.52%、0.37%、0.44%, 结果表明本法精密性良好。

2.2.7 稳定性试验 按“2.2.1”项下色谱条件, 分别在 0、2、4、6、8、12 h 时进样测定同一供试品溶液的峰面积, 记录峰面积, 计算秦皮甲素、秦皮苷、秦皮乙素、秦皮素峰面积 RSD 分别为 1.32%、1.62%、0.89%、2.04%, 结果表明供试品溶液在 12 h 内基本稳定。

2.2.8 重复性试验 取同一样品 6 份, 每份 0.5 g, 按照“2.2.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.2.1”项下色谱条件测定, 记录峰面积, 计算秦皮甲素、秦皮苷、秦皮乙素、秦皮素峰面积 RSD 分别为 1.44%、1.78%、1.62%、1.93%, 表明本方法重复性良好。

2.2.9 加样回收率试验 取已测定 4 种香豆素含量样品 6 份, 每份 0.25 g, 分别加入一定量秦皮甲素、秦皮苷、秦皮乙素、秦皮素对照品溶液, 按照“2.2.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.2.1”项下色谱条件测定峰面积。结果秦皮甲素、秦皮苷、秦皮乙素、秦皮素的平均回收率分别为 101.42%、99.32%、98.21%、96.83%, RSD 分别为 1.66%、1.45%、1.73%、2.02%, 结果表明本方法回收率良好。

2.3 秦皮的炮制

2.3.1 传统饮片 取新鲜秦皮药材, 室外自然晒干,

快速淋洗去除附着杂质,加水闷润至内外水分一致,刮去粗皮,切宽丝,恒温烘箱中干燥。

2.3.2 一体化加工饮片 取新鲜秦皮药材,趁鲜刮去粗皮,快速淋洗去除附着杂质,切宽丝,恒温烘箱中干燥。

2.4 单因素实验

2.4.1 切丝规格 《中国药典》2015年版四部炮制通则规定饮片切丝的范围为2~10 mm,其中2~3 mm为细丝,5~10 mm为宽丝。药典对秦皮丝切丝范围没有明确规定为细丝或宽丝,而《陕西省中药饮片标准》规定秦皮丝宽3~5 mm,介于细丝与宽丝中间,因此本实验选择2、4、6、8、10 mm 5个规格进行考察,取秦皮鲜药材适量,刮去粗皮,抢水洗净杂质,分别切制为约2、4 mm的细丝及约6、8、10 mm的宽丝,60℃干燥至水分达标。考察不同切制规格对秦皮甲素、秦皮乙素、秦皮素、秦皮苷和总香豆素的总评归一值^[17] [overall desirability value, OD值,利用Hassan法对各效应值进行归一化,本次实验的效应值为有效成分的含量,含量越高越好,因此,归一值 $d_i = (y_i - y_{\min}) / (y_{\max} - y_{\min})$,再对归一值求几何平均值, $OD = (d_1, d_2, \dots, d_n)^{1/n}$]的影响,OD值分别为0.868、0.734、0.761、0.571、0.408。随着切制规格的增加,OD值呈现降低的趋势,但是2 mm和4 mm的细丝在干燥后出现分层的现象,因此选择6、10 mm为后续优化实验的最低、最高水平。

2.4.2 干燥温度 取秦皮鲜药材适量,刮去粗皮,抢水洗净杂质,切6 mm的宽丝,分别在30、45、60、75、90℃干燥至水分达标。考察不同干燥温度对秦皮甲素、秦皮乙素、秦皮素、秦皮苷和总香豆素的OD值的影响,OD值分别为0.695、0.712、0.934、1.000、0.772。随着干燥温度的增加,OD值呈现先增大再减小的趋势,因此选择30、75℃为后续优化实验的最低、最高水平。

2.4.3 干燥时间 取秦皮鲜药材适量,刮去粗皮,抢水洗净杂质,切6 mm的宽丝,分别在75℃干燥1、2、3、4、5 h。考察不同干燥时间对秦皮甲素、秦皮乙素、秦皮素、秦皮苷和总香豆素OD值的影响,OD值分别为0.693、0.886、0.892、0.926、0.972。随着干燥时间的增加,OD值呈现逐渐增大的趋势,但是1 h的样品水分为18.86%,不符合要求,因此选择2、5 h为后续优化实验的最低、最高水平。

2.5 响应面优化秦皮一体化炮制工艺

2.5.1 试验设计及结果 根据单因素对可能影响秦皮饮片质量的产地加工与炮制一体化技术中的工艺因素考察,选取了切制规格(X_1)、干燥温度(X_2)、干燥时间(X_3)3个考察因素,每个因素选取了3个水平,以秦皮甲素、秦皮乙素、秦皮素、秦皮苷和总香豆素的OD值为响应值,形成3因素3水平星点设计试验对秦皮饮片的一体化最佳工艺进行优化确定。采用Design-Expert 8.05b软件的星点设计方案安排17组秦皮一体化炮制工艺条件,因素水平、试验安排及结果见表1。

2.5.2 方差分析及数据处理 以秦皮中所含成分的总评值为因变量,对切制规格、干燥温度、干燥时间各因素进行二项式拟合,得到二项式拟合的复相关系数 $r^2 = 0.9613$,模型 $P < 0.001$,具有较高显著性,说明拟合的模型能够进行秦皮产地加工炮制一体化工艺的分析 and 预测。由方差分析(表2)可以看出,3个因素的1次项、2次项都具有显著性差异,说明各个具体试验因子对响应值的影响不是简单的线性关系。因此,选择二项式拟合模型。二项式拟合方程为 $OD = 0.67 - 0.11 X_1 + 0.12 X_2 + 0.052 X_3 - 8.950 \times 10^{-3} X_1 X_2 + 0.043 X_1 X_3 - 0.024 X_2 X_3 - 0.054 X_1^2 - 0.040 X_2^2 - 0.042 X_3^2$ 。

由表2可知,切制规格和干燥温度对秦皮有效成分的归一值影响最大($P < 0.0001$),干燥时间也有极显著影响($P < 0.01$)。回归方程失拟性检验 $P = 0.5756 > 0.05$,无显著性差异,说明模型拟合度良好;二项式模型 $P < 0.0001$,达极显著水平,说明该方程与实际情况拟合良好,模型的残差可能是随机误差产生,可用此模型和方程来分析预测最佳炮制一体化工艺条件,秦皮有效成分的OD值与任意2个因素的三维效应面曲线见图2。以秦皮有效成分的OD值最大为目标,根据Design Expert 8.05b实验设计软件得秦皮一体化炮制工艺最优参数为切6 mm,干燥温度75℃,干燥时间3.23 h,OD预测最大值为0.823。

2.6 验证试验

根据“2.5.2”优选出的最佳工艺及实际操作条件调整为秦皮鲜药材刮去粗皮,洗净杂质,切6 mm宽丝,干燥温度75℃,干燥时间3.25 h,制备3批样品,测定各指标成分含量,结果见表3。由表3中最佳一体化工艺所得的秦皮的含量测定结果可见,有效成分总含量的实际值与预测值相比较,偏

表 1 星点设计试验与考察结果

Table 1 Design and survey results of star point design test

试验号	X_1/mm	$X_2/^\circ\text{C}$	X_3/h	秦皮甲素/%	秦皮乙素/%	秦皮素/%	秦皮苷/%	总香豆素/%	OD 值
1	8 (0)	30 (-1)	5 (+1)	0.45	0.09	0.04	0.32	1.01	0.560 9
2	8	52.5 (0)	3.5 (0)	0.97	0.11	0.05	0.78	2.11	0.688 7
3	8	75 (+1)	5	0.42	0.08	0.08	0.37	1.12	0.725 6
4	10 (+1)	52.5	5	0.51	0.08	0.03	0.39	1.21	0.536 9
5	10	30	3.5	1.03	0.18	0.06	0.63	1.94	0.346 2
6	8	52.5	3.5	0.97	0.19	0.06	0.8	2.13	0.688 7
7	6 (-1)	75	3.5	0.72	0.12	0.05	0.59	1.65	0.823 3
8	8	52.5	3.5	0.42	0.29	0.11	0.37	1.32	0.688 7
9	10	75	3.5	0.29	0.35	0.14	0.29	1.14	0.608 5
10	10	52.5	2 (-1)	0.86	0.19	0.08	0.65	1.92	0.353 1
11	8	30	2	0.45	0.24	0.10	0.41	1.32	0.402 6
12	6	30	3.5	0.95	0.16	0.08	0.83	2.11	0.525 2
13	6	52.5	5	0.96	0.12	0.05	0.69	1.95	0.708 9
14	8	52.5	3.5	1.00	0.10	0.05	0.65	1.87	0.592 8
15	6	52.5	2	0.54	0.22	0.08	0.53	1.53	0.696 0
16	8	52.5	3.5	1.08	0.16	0.05	0.85	2.34	0.688 7
17	8	75	2	0.89	0.29	0.09	0.79	2.17	0.664 1

表 2 方差分析

Table 2 Analysis of variance

方差来源	偏差平方和	自由度	F 值	P 值	显著性	方差来源	偏差平方和	自由度	F 值	P 值	显著性
模型	0.29	9	19.31	0.000 4	**	X_1^2	0.012	1	7.51	0.028 9	*
X_1	0.10	1	62.78	<0.000 1	**	X_2^2	6.594×10^{-3}	1	4.01	0.085 3	
X_2	0.12	1	74.01	<0.000 1	**	X_3^2	7.303×10^{-3}	1	4.44	0.073 0	
X_3	0.022	1	13.19	0.008 4	**	残差	0.012	7			
X_1X_2	3.204×10^{-4}	1	0.19	0.672 2		失拟项	4.151×10^{-3}	3	0.75	0.575 6	
X_1X_3	7.302×10^{-3}	1	4.44	0.073 1		误差	7.357×10^{-3}	4			
X_2X_3	2.343×10^{-3}	1	1.42	0.271 5		总离差	0.30	16			

* $P < 0.05$ 为显著项, ** $P < 0.01$ 为极显著项

* $P < 0.05$ significant difference, ** $P < 0.01$ more significant difference

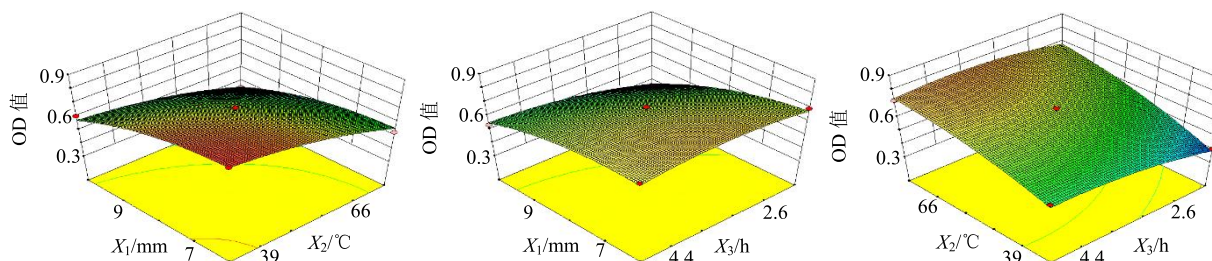


图 2 切制规格、干燥温度和干燥时间的交互作用响应面

Fig. 2 3D response surface of cutting thickness, drying temperature and time for their mutual interaction

差都较小,表明本实验所建立的数学模型准确可靠,优化出的一体化最佳工艺重现性好。与传统加工的

秦皮饮片比较,一体化炮制品中 4 种有效成分和总香豆素含量均较高,除了传统饮片水处理的时候会

表 3 验证试验结果 ($n=3$)Table 3 Results of verification test ($n=3$)

加工方式	秦皮甲素/%	秦皮乙素/%	秦皮素/%	秦皮苷/%	总香豆素/%	OD 值	RSD/%
一体化加工	1.03	0.25	0.11	0.62	2.23	0.820 6	2.29
传统加工	0.72	0.21	0.08	0.43	1.48	0.592 7	3.34

造成损失外,传统秦皮饮片残留的部分栓皮也导致整个秦皮饮片的含量较低。以上结果表明该最佳工艺切实可行,可操作性强。

2.7 一体化工艺与传统工艺饮片药效的比较

2.7.1 对大鼠的抗炎作用 雄性 SD 大鼠 30 只,分为 3 组,依次为模型组、一体化加工秦皮组、传统秦皮饮片组,2 组秦皮饮片组大鼠 ig 7.2 g/kg 提取物(按生药量算)^[18],模型组大鼠 ig 10 mL/kg 生理盐水,每天 1 次,连续 7 d。末次给药结束 1 h 后,各组分别在大鼠右足趾部 sc 1%角叉菜胶溶液 0.1 mL 致炎^[19],标记右足测量部位,分别在致炎前与

致炎后 1、2、3、4、5 h 测量右足厚度,参考文献方法计算大鼠足肿胀度(足肿胀度=致炎后足厚度-致炎前足厚度)^[20]。

一体化秦皮饮片和传统秦皮饮片对炎症模型大鼠足肿胀程度的结果见表 4,由结果可知一体化秦皮饮片和传统秦皮饮片均能明显减轻角叉菜胶引起的小鼠足趾肿胀,显示出较好的抗急性炎症作用,尤其一体化秦皮饮片较传统秦皮饮片抑制肿胀作用更加明显,但是两者之间无显著性差异,其 5 h 肿胀抑制率可达 26.3%。

2.7.2 对小鼠的镇痛作用 雄性 KM 小鼠 30 只,

表 4 各组大鼠足肿胀度 ($\bar{x} \pm s, n=10$)Table 4 Swelling degree of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	足肿胀度					抑制率/%
	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	
模型	0.11±0.08	0.21±0.04	0.28±0.07	0.34±0.05	0.38±0.03	
传统秦皮	0.15±0.06	0.25±0.04	0.33±0.05	0.34±0.11	0.31±0.07 [#]	18.4
一体化秦皮	0.13±0.09	0.27±0.06	0.31±0.13	0.31±0.09	0.28±0.07 [#]	26.3

与模型组比较: [#] $P<0.05$

[#] $P<0.05$ vs model group

分为 3 组,依次为模型组、传统秦皮饮片组、一体化加工秦皮组,2 组秦皮饮片组大鼠 ig 7.2 g/kg 提取物,模型组大鼠 ig 10 mL/kg 生理盐水,每天 1 次,连续 7 d。末次给药结束后 30 min,每只小鼠均 ip 0.7%冰醋酸 0.2 mL。注射完毕后立即计时,记录小鼠出现扭体反应的潜伏期及 15 min 内的扭体次数,并计算药物对小鼠扭体反应的抑制率。

一体化秦皮饮片和传统秦皮饮片对小鼠扭体反应的抑制率结果见表 5,由结果可知一体化秦皮饮片和传统秦皮饮片均能明显延长小鼠扭体反应的潜伏期,减少扭体次数,显示出较好的镇痛作用,尤其一体化秦皮饮片较传统秦皮饮片镇痛作用更加明显,且镇痛率两者之间具有显著性差异($P<0.05$),其镇痛率可达 22.4%。

3 讨论

在单因素试验的基础上,本实验采用多指标归一化评分法对秦皮的产地加工与炮制一体化工艺进

表 5 各组小鼠对冰醋酸致扭体反应的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)Table 5 Effect of wrinkle reaction induced by acetic acid on mice ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	潜伏期/min	扭体次数	镇痛率/%
模型	4.23±1.16	28.5±3.8	
传统秦皮	6.38±0.86 [#]	24.3±4.6	14.7
一体化秦皮	8.45±1.09 [#]	22.1±2.7 [#]	22.4 [▲]

与模型组比较: [#] $P<0.05$; 与传统秦皮饮片组比较: [▲] $P<0.05$

[#] $P<0.05$ vs model group; [▲] $P<0.05$ vs traditional technology group

行优选,结果表明方差分析及综合评分的结果具有一致性,确定了秦皮的最佳一体化工艺;一体化加工的秦皮饮片与传统加工秦皮饮片在香豆素类成分的定量分析结果显示,一体化工艺优于传统加工工艺,与传统秦皮加工的水处理导致成分流失和栓皮等非药用部位难以处理有关。

对角叉菜胶致大鼠足肿胀模型以及醋酸引起的小鼠疼痛模型的影响结果表明,一体化工艺与传统

工艺均有一定的抗炎症镇痛效果,且一体化工艺所得饮片效果优于传统工艺组。有研究表明,秦皮香豆素类成分(尤其是秦皮甲素)具有消炎、镇痛的功效^[21-24],药理实验结果与成分定量测定结果具有一致性,但是秦皮香豆素类成分抗炎镇痛的具体机制需要进一步研究。

综上所述,秦皮加工一体化工艺与传统工艺相比,在化学成分含量方面,药典规定的指标成分以一体化工艺更好;药效方面,2种加工工艺均有一定抗炎镇痛作用,且以一体化工艺所得饮片作用较优,但两者功效无显著性差异。同时一体化工艺相对传统工艺,缩短了加工周期,同时解决了饮片传统生产方式中原料药材软化时间长且软化程度不一致导致饮片质量不稳定的问题,以及晒干药材粗皮难以去处的问题,为秦皮饮片生产模式的变革提供借鉴。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 刘丽梅,王瑞海,陈琳,等. 不同基原秦皮、香豆素单体抗菌作用对比研究 [J]. 中国中医药信息杂志, 2009, 16(5): 39-42.
- [3] 王瑞海,柏冬,刘寨华,等. 秦皮总香豆素大孔树脂纯化工艺研究 [J]. 中草药, 2015, 46(22): 3344-3351.
- [4] 杨庆,翁小刚,聂淑琴,等. 不同基原秦皮、香豆素单体以及不同指纹区样品对内毒素刺激单核-巨噬细胞株分泌炎症因子的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(13): 127-131.
- [5] Chen X W, Ying X Z, Zhang W W, et al. The hepatoprotective effect of fraxetin on carbon tetrachloride induced hepatic fibrosis by antioxidative activities in rats [J]. *Int Immunopharmacol*, 2013, 17(3): 543-547.
- [6] 聂安政,林志健,张冰. 秦皮化学成分和药理作用研究进展 [J]. 中草药, 2016, 47(18): 3332-3341.
- [7] 邓严冰,甘我挺,郭宝林,等. 桂枝地骨皮等5种藤茎及皮类药材商品电子交易规格等级标准 [J]. 中国现代中药, 2016, 18(11): 1410-1415.
- [8] 黎丹,姜巧芳,白吉庆,等. 树龄对秦岭白蜡树树皮中秦皮甲素、秦皮乙素与秦皮素含量的影响 [J]. 中南药学, 2016, 14(1): 60-62.
- [9] 王景媛,翟思程,王昌利,等. 秦皮产地加工与炮制一体化技术研究 [J]. 陕西中医学院学报, 2017, 40(5): 79-81.
- [10] 马盼盼,冯青云,马政瑶,等. 星点设计-效应面法优化舒肺原位凝胶的制备工艺及体外评价 [J]. 中草药, 2018, 49(12): 2826-2832.
- [11] 吕维,吴恋,罗红丽,等. 星点设计-效应面法优化川芎提取工艺 [J]. 药物评价研究, 2014, 37(1): 53-57.
- [12] 王博,李洪起,连潇嫣,等. 星点设计-效应面法优化阿德福韦-β-环糊精包合物制备工艺的研究 [J]. 现代药物与临床, 2014, 29(11): 1227-1230.
- [13] 叶迎,柏冬,包强,等. 秦皮提取物中香豆素类成分含量测定方法研究 [J]. 中国中医药信息杂志, 2015, 22(8): 83-87.
- [14] 王瑞海,柏冬,刘寨华,等. 秦皮总香豆素大孔树脂纯化工艺研究 [J]. 中草药, 2015, 46(22): 3344-3351.
- [15] 王瑞海,柏冬,刘寨华,等. 秦皮总香豆素不同提取工艺的对比研究 [J]. 中国中医药信息杂志, 2015, 22(10): 86-90.
- [16] 冯伟红,王智民,张启伟,等. 一测多评法测定秦皮药材与饮片中香豆素类成分的含量 [J]. 中国中药杂志, 2011, 36(13): 1782-1789.
- [17] 李晓尧,张丹,汤丽芝,等. HPLC法同时测定秦皮中四种成分含量的研究 [J]. 陕西中医, 2016, 37(9): 1238-1240.
- [18] 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.
- [19] 沈淑洁,水素芳,肖炳坤,等. 基于¹H-NMR及LC-MS技术研究金铃子散对炎症大鼠模型调节机制的影响 [J]. 中国中药杂志, 2017, 42(2): 363-369.
- [20] 白小军,杨锋,呼睿,等. 消肿止痛膏对足肿胀模型大鼠足肿胀度的影响 [J]. 陕西中医, 2017, 38(8): 1144-1145.
- [21] 罗玫,刘芳,邹建东,等. 秦皮总香豆素对原发性急性痛风性关节炎止痛效应的探索性临床试验 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2005(4): 475-478.
- [22] 曹世霞,祝捷,张三印,等. 秦皮总香豆素对急性痛风性关节炎大鼠模型IL-1β、IL-8、TNF-α的影响 [J]. 四川中医, 2011, 29(3): 68-70.
- [23] 王颖,李颖晨,李蕾,等. 藏药八味秦皮丸含朱砂与否对小鼠镇痛抗炎药效作用的影响 [J]. 西南民族大学学报:自然科学版, 2017, 3(5): 500-503.
- [24] 杨欢,程笑,王月华,等. 秦皮甲素对角叉菜胶致小鼠足肿胀及炎症的作用 [J]. 中国新药杂志, 2016, 25(20): 2319-2322.