

基于热分析及综合评价的栀子炭炮制工艺研究

吕辰子, 张晓燕, 苏晓娟, 宁晨旭, 王 勃, 孟祥龙, 张朔生*

山西中医药大学中药学院, 山西 晋中 030619

摘要: 目的 优化栀子炭炮制工艺, 并结合药效学研究对所得炮制工艺进行验证。方法 运用热分析技术分别对栀子中不同有效成分进行热解特性分析, 得出栀子炭最佳炮制温度范围; 同时, 以栀子炭中鞣质含量为指标, 选择炒制温度、炒制时间 2 个因素, 结合响应面法试验优化栀子炭炮制工艺, 并通过药效学实验(止血实验)对栀子炭炮制工艺进行验证。结果 热分析实验综合分析得出栀子炭最佳炮制温度为 290.3~387.0 °C; 响应面法优化得出栀子炭最优炮制工艺为炒制温度 330 °C, 炒制时间 5.91 min; 与空白组比较, 新法组、传统组均能极显著缩短小鼠凝血时间 ($P < 0.01$), 生品组能显著缩短小鼠凝血时间 ($P < 0.05$); 新法组能显著缩短小鼠活化部分凝血活酶时间 (APTT) ($P < 0.05$), 对小鼠凝血酶原时间 (PT)、凝血酶时间 (TT) 的影响差异不显著。结论 结合热分析技术和响应面法优化栀子炭炮制工艺, 并进行相关药效学实验验证, 结果合理可行, 该法可为改进传统中药炮制工艺, 合理量化炮制过程中火力火候参数提供借鉴。

关键词: 栀子炭; 热分析技术; 炮制工艺; 响应面法; 止血; 药效学; 热解特性; 鞣质; 凝血时间; 活化部分凝血活酶时间; 凝血酶原时间; 凝血酶时间

中图分类号: R283.1

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2019)21-5253-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.21.018

Study on processing technology of *Gardenia jasminoides* carbon based on thermal analysis and comprehensive evaluation

LV Chen-zi, ZHANG Xiao-yan, SU Xiao-juan, NING Chen-xu, WANG Bo, MENG Xiang-long, ZHANG Shuo-sheng

College of Traditional Chinese Medicine, Shanxi University of Chinese Medicine, Jinzhong 030619, China

Abstract: **Objective** To optimize the processing technology of *Gardenia jasminoides* carbon and validate the process with pharmacodynamics research. **Methods** The pyrolysis characteristics of different active components in *G. jasminoides* were analyzed by thermal analysis technology, and the optimum processing temperature range of *G. jasminoides* carbon was obtained; Taking the tannin content in *G. jasminoides* carbon as the index, two factors of stir-frying temperature and stir-frying time was chosen to optimize the processing technology of *G. jasminoides* carbon by response surface methodology, and the processing technology of *G. jasminoides* carbon was verified by pharmacodynamics experiment (hemostasis test). **Results** The optimum processing temperature range of *G. jasminoides* carbon was 290.3—387 °C, response surface methodology was used to optimize the processing technology of *G. jasminoides* carbon: The processing temperature was 330 °C, the processing time was 5.91 min, and the tannin content was 3.120 mg/g; Compared with the blank group, the new method group and the traditional group could significantly shorten the clotting time of mice ($P < 0.01$), raw product group can significantly shorten the clotting time of mice ($P < 0.05$), the new method group can significantly shorten APTT in mice ($P < 0.05$), there was no significant difference in PT and TT in mice. **Conclusion** The processing technology of *G. jasminoides* carbon was optimized by thermal analysis technology and response surface methodology, and the results were verified by pharmacodynamics experiments. The method can provide a reference for improving the processing technology of Chinese materia medica and quantifying the fire parameters in the process of processing.

Key words: *Gardenia jasminoides* carbon; thermal analysis technology; processing technology; response surface methodology; hemostasis; pharmacodynamics; pyrolysis characteristics; tannin; coagulation time; activated partial thromboplastin time; prothrombin time; thrombin time

收稿日期: 2019-06-18

基金项目: 山西省科技厅重点研发计划重点项目: 12 种优质中药饮片规范化炮制加工工艺及质量标准研究 (201603D3112002)

作者简介: 吕辰子, 在读硕士研究生, 研究方向为中药炮制现代研究。Tel: 18435166779 E-mail: lcz18435166779@163.com

*通信作者 张朔生, 博士生导师, 教授, 从事中药炮制现代研究。Tel: (0351)3179909 E-mail: zhangshuosheng@aliyun.com

梔子入药始载于《神农本草经》^[1], 为我国传统药食两用中药, 药用梔子为茜草科植物梔子 *Gardenia jasminoides* Ellis 的干燥成熟果实, 具有泻火除烦、清利湿热、凉血解毒, 外用消肿止痛之功效^[2-3]。梔子古今炮制方法众多, 清炒法(炒黄、炒焦、炒炭)、酒制、姜制等沿用至今^[4-5]。传统中医药理论认为“血见黑止”, 《十药神书注解》^[6]中记载的“十灰散”以梔子等 10 味药材烧灰存性, 研极细末得来, 用于治癆症、呕血、吐血、咯血、嗽血等症。现代药理研究表明梔子炒炭后, 寒性降低, 止血功能增强, 善于凉血止血, 多用于吐血、咯血、衄血、尿血、崩漏下血等。

热分析技术是在程序控制温度下, 测量物质的物理性质与温度关系的一类技术, 广泛应用于塑料、橡胶、涂料、药品^[7-8]、催化剂、无机材料等各个领域。本课题组已尝试将热分析技术应用于中药炮制现代研究中, 应用热重(TG)/微商热重(DTG)技术模拟炮制过程, 在量化中药炮制火力火候工艺参数方面做了相关研究^[9-11]。本研究通过热分析技术对梔子中主要化学成分^[12]总环烯醚萜类、总黄酮类和总有机酸类进行热解特性研究, 并结合响应面法, 以梔子炭中鞣质含量为指标进行工艺优化, 同时对所得炮制工艺进行药效学实验验证, 为建立梔子炭饮片质量标准及其规范化生产提供实验依据。

1 仪器与材料

STA449-F5 型热重-差热同步热分析仪, 德国耐驰公司; Spectrophotometer 紫外可见分光光度计, 上海美谱达仪器有限公司; AR223CN 分析天平, 美国奥豪斯公司; ABL 系列多功能炒药机, 兰州阿泊罗电子设备有限公司, 规格 25 L, 投料量 ≥ 100 g; Start4 半自动凝血仪, 法国 Diagnostica Stago 公司。对照品没食子酸(批号 18032703, 质量分数 98%)、芦丁(批号 131208, 质量分数 98%), 成都普菲德生物技术有限公司; 对照品梔子苷, 批号 MUST-18032401, 质量分数 99.03%, 成都曼斯特生物科技有限公司; 磷钼钨酸, 北京华科盛精细化工产品贸易有限公司, 批号 20190428; 无水碳酸钠, 天津市科密欧化学试剂有限公司, 批号 20140819; 干酪素, 上海麦克林生化科技有限公司, 批号 C10295495; 柠檬酸钠, 天津市北辰方正试剂厂, 批号 20190102; 活化部分凝血活酶时间(APTT)试剂盒(批号 111062)、凝血酶原时间(PT)试剂盒(批号 105375)、凝血酶时间(TT)试剂盒(批号 121218), 上海太

阳生物技术有限公司。梔子药材购于北京同仁堂(晋中分店), 经山西中医药大学中药学院张朔生教授鉴定为茜草科植物梔子 *Gardenia jasminoides* Ellis 的干燥成熟果实。雄性昆明种小鼠, 体质量 20~25 g, 由斯贝福(北京)生物技术有限公司提供, SPF 级, 合格证号 11401500055320, 生产许可证号 SCXK(京)2016-0002。

2 方法与结果

2.1 热分析实验

2.1.1 梔子药材粉末样品制备 称取梔子药材 100 g, 粉碎, 过 40 目筛, 备用。

2.1.2 梔子醇浸出物样品制备 按《中国药典》2015 年版四部通则 2201 制备梔子醇浸出物, 蒸干溶剂, 残渣研碎, 过 40 目筛, 即得。

2.1.3 梔子总环烯醚萜类提取物样品制备^[13] 取 10 g 梔子粉末, 置圆底烧瓶中, 加 50%乙醇 350 mL 置水浴 90 °C 回流提取 1 h, 滤过收集滤液, 浓缩挥干溶剂, 残渣研碎, 过 40 目筛, 即得。精密称定所得粉末 0.01 g, 以梔子苷为对照品, 采用紫外分光光度法测定粉末中总环烯醚萜类化合物的质量分数为 75.24%, 回归方程为 $Y=20.517 X+0.206 8$, $r^2=0.998 1$, 线性范围为 5.6~22.4 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.1.4 梔子总有机酸提取物样品制备^[14] 取 10 g 梔子粉末, 置圆底烧瓶中, 加 70%乙醇 70 mL 置水浴上 95 °C 回流提取, 滤过, 提取 3 次, 每次 1.5 h, 合并滤液, 并浓缩至相对密度 1.05 (60 °C), 浓盐酸调 pH 至 2~3, 加醋酸乙酯 10 mL 萃取 3 次, 减压回收醋酸乙酯, 浓缩至稠膏, 加适量乙醇溶解, 滤过, 挥干滤液, 残渣研碎, 过 40 目筛, 即得。精密称定所得粉末 0.01 g, 采用酸碱滴定法测定粉末中总有机酸质量分数为 82.35%。

2.1.5 梔子总黄酮提取物样品制备^[15] 称取 10 g 梔子粉末, 置圆底烧瓶中, 加 60%乙醇 200 mL, 80 °C 水浴回流提取 2.5 h, 收集滤液, 浓缩并挥干溶剂, 残渣研碎, 过 40 目筛, 即得。精密称定粉末 0.01 g, 以芦丁为对照品, 采用紫外分光光度法测定粉末中总黄酮化合物的质量分数为 77.54%, 回归方程为 $Y=1.353 3 X+0.039 4$, $r^2=0.997 5$, 线性范围为 0.04~0.20 mg/mL。

2.1.6 热分析实验 以模拟空气($\text{N}_2\text{-O}_2$ 4:1)为载气, 升温速率为 10 °C/min, 体积流量为 60 mL/min, 分别取生梔子药材粉末、梔子醇浸出物、梔子总环烯醚萜类提取物、梔子总黄酮提取物、梔子总有机

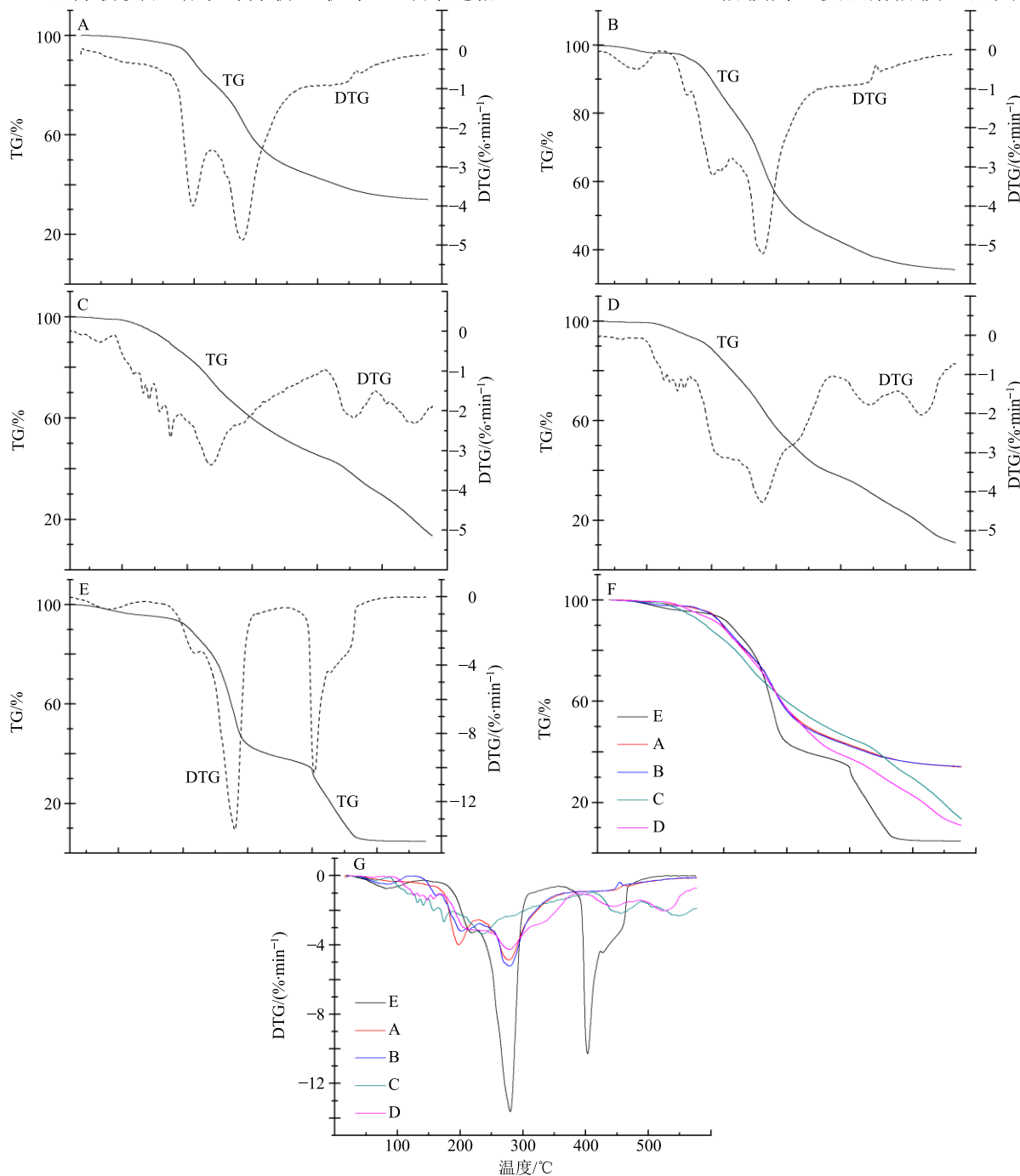
酸提取物等试样量 (30 ± 5) mg, 水平均匀分散于坩埚中, 在模拟空气的条件下对其进行热解特性的研究, 从室温升至 $580\text{ }^{\circ}\text{C}$, 每个样品平行 2 次实验。

2.1.7 数据处理 采用 Origin 8.0 进行数据处理。

2.1.8 热分析实验结果与分析 栀子总环烯醚萜

类、总黄酮类、总有机酸类提取物 TG-DTG 曲线见图 1-A~C、浸出物 TG-DTG 曲线见图 1-D, 原药材 TG-DTG 曲线见图 1-E, 相关参数见表 1。

对比总环烯醚萜类提取物燃烧热解特性可知, $225.7 \sim 351.6\text{ }^{\circ}\text{C}$ 阶段为主要热解阶段, 热失重为



A-总环烯醚萜类提取物 TG-DTG 曲线 B-总黄酮类提取物 TG-DTG 曲线 C-总有机酸提取物 TG-DTG 曲线 D-醇浸出物 TG-DTG 曲线 E-栀子生品 TG-DTG 曲线 F-所有样品 TG 曲线 G-所有样品 DTG 曲线

A-TG-DTG curve of total iridoid extracts B-TG-DTG curve of total flavonoids extracts C-TG-DTG curve of total organic acid extract D-TG-DTG curve of alcohol extract E-TG-DTG curve of *G. jasminoides* F-TG curves of all samples G-DTG curves of all samples

图 1 栀子及其主要有效成分热解特性曲线

Fig. 1 Pyrolysis characteristic curves of *G. jasminoides* and its main active components

表 1 梔子原药材及不同有效成分的热解特性参数

Table 1 Pyrolysis parameters of *G. jasminoides* and its four active ingredients

样品	燃烧热阶段	DTG _{max} / (%·min ⁻¹)	Mass/ %
原药材	脱水阶段 室温~167.6 °C	0.41	5.14
	167.6~216.2 °C	3.26	6.24
	主要热解 216.2~290.3 °C	13.63	41.84
	阶段 290.3~403.4 °C	10.28	16.16
	403.4~465.3 °C	1.41	23.86
醇浸出物	脱水阶段 室温~126.8 °C	1.04	1.91
	126.8~165.9 °C	1.14	4.11
	主要热解 165.9~387.0 °C	4.26	55.11
	阶段 387.0~525.2 °C	2.03	27.87
	总环烯醚萜类 脱水阶段 室温~160.2 °C	0.62	3.60
总黄酮类	160.2~225.7 °C	3.99	14.22
	主要热解 225.0~351.6 °C	4.87	34.71
	阶段 351.6~565.3 °C	1.21	13.25
	脱水阶段 室温~162.1 °C	1.16	3.57
	主要热解 162.1~346.9 °C	5.22	48.89
总有机酸类	阶段 346.9~572.4 °C	1.22	13.21
	脱水阶段 室温~87.8 °C	0.27	6.17
	主要热解 87.8~411.2 °C	3.36	54.73
	阶段 411.2~562.0 °C	2.16	30.88

DTG_{max}-最大热失重速率 Mass-热失重率DTG_{max}-maximum thermogravimetric rate Mass-thermogravimetric rate

34.71%，在 282.2 °C 时出现强度为 4.87%/min 的热解燃烧阶段热失重速率峰值；由总黄酮类提取物燃烧热解特性可知，162.1~346.9 °C 阶段为主要热解阶段，热失重为 48.89%，在 284.3 °C 时出现强度为 5.22%/min 的热解燃烧阶段热失重速率峰值；对比总有机酸类提取物燃烧热解特性可知，87.8~411.2 °C 阶段为主要热解阶段，热失重为 54.73%，在 239.4 °C 时出现强度为 3.36%/min 的热解燃烧阶段热失重速率峰值；对比梔子浸出物燃烧热解特性可知，165.9~387.0 °C 阶段为主要热解阶段，热失重为 55.11%，在 287.1 °C 出现强度为 4.26%/min 的热解燃烧阶段热失重速率峰值。总环烯醚萜类、总黄酮类提取物和浸出物均在 280~290 °C 出现较强的热失重速率峰（图 1-E、F）。对比生品热解燃烧特性曲线可知，290.3~403.4 °C 阶段热失重为 16.16%，在传统武火炮制下，梔子中总环烯醚萜类、总黄酮类、总有机酸类成分含量大幅度降低，但并未消失，以此为依据，结合炮制适度理论可推测梔子炒炭温度起点为高于 290.3 °C，结合梔子生品及浸出物 TG-DTG 曲线可知，梔子炒炭温度终点为不高于 387 °C，由此可推测梔子炒炭最佳炮制温度为

290.3~387.0 °C。

2.2 鞣质含量测定^[16]

2.2.1 线性关系考察 以 80%乙醇为溶剂配制质量浓度为 92 μg/mL 的没食子酸对照品溶液。分别精密吸取没食子酸对照品溶液 0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8 mL 于 10 mL 量瓶，分别补水 3.8、3.7、3.6、3.5、3.4、3.3、3.2 mL，加入 1 mL 磷钼钨酸试剂，摇匀后静置 5 min；再以 10%碳酸钠溶液定容至刻度，摇匀，避光放置 90 min，以 80%乙醇溶液作空白组，于 760 nm 波长处测定吸光度（A）值。以 A 值为纵坐标（Y），没食子酸质量浓度为横坐标（X），绘制标准曲线，进行线性回归，得回归方程为 $Y=115.61X-0.0173$ ， $r^2=0.9988$ ，线性范围为 1.84~7.36 μg/mL。

2.2.2 供试品溶液制备 样品粉碎后过 40 目筛，取 0.15 g，精密称定后加入 50 mL 80%乙醇溶液，30 °C 以下超声提取 30 min，取出放冷后称定质量，以 80%乙醇补足损失质量，离心后滤过，滤液即为供试品溶液。

2.2.3 测定方法

（1）总多酚的定量测定：取供试品溶液适量于 10 mL 量瓶中，加水至 4.0 mL，先加入 1 mL 磷钼钨酸试剂，摇匀，静置 5 min，再以 10%碳酸钠溶液定容至刻度，摇匀，避光放置 90 min，以试剂作空白组，测定其在 760 nm 波长处的 A 值，按“2.2.1”项标准曲线计算所测样品中总多酚的质量浓度，计算梔子炭中总多酚量。

（2）不被吸附多酚的定量测定：取供试品溶液适量，按 0.05 g/mL 加入干酪素，30 °C 水浴 30 min，时时振摇。水浴后离心、滤过，按总多酚定量测定方法，以加入干酪素的试剂作空白组，测定其在 760 nm 波长处的 A 值。按“2.2.1”项标准曲线计算所测样品中不被吸附多酚的质量浓度，所得结果为不被吸附多酚量。

（3）鞣质的定量测定：根据《中国药典》2015 年版四部通则中计算鞣质含量公式得到。

鞣质的量=总多酚量-不被吸附多酚量

2.2.4 精密度试验 精密吸取响应面试验 2 号样品溶液 0.15 mL，采用“2.2.3”项方法测定 A 值，连续 6 次，RSD 为 0.13%，表明仪器精密度良好。

2.2.5 稳定性试验 精密吸取响应面试验 2 号样品溶液 0.15 mL，按“2.2.3”项方法于 30、60、90、120、150、180 min 测定 A 值，180 min 内 A 值较为

稳定, RSD 为 1.06%。

2.2.6 重复性试验 取响应面试验 2 号样品, 依“2.2.2”项下供试品溶液制备方法, 分别平行制样 6 份。分别精密取溶液 0.15 mL, 按“2.2.3”项方法测定鞣质的量, 平行试验 6 次, 得其 RSD 为 1.22%, 表明该方法重复性良好。

2.2.7 加样回收试验 精密称取响应面试验 2 号样品 9 份, 每份 0.15 g, 分别按样品总多酚量的 50% (3 份)、100% (3 份) 和 150% (3 份), 精密加入没食子酸对照品。按“2.2.3”项方法测量没食子酸的量, 计算得没食子酸平均回收率为 101.4%, RSD 为 2.12%, 表明加样回收率良好。

2.3 单因素实验考察栀子炒炭炮制工艺

2.3.1 炒制温度对栀子炭炮制工艺的影响 取栀子碎块 5 份, 每份 100 g, 置炒药机内, 在温度为 290、300、330、350、370 °C 下炒制 5 min, 取出晾凉, 即得栀子炭饮片。将制备好的栀子炭按照“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 然后按照“2.2.3”项下方法测定鞣质质量分数分别为 1.652、1.845、2.521、1.647、0.946 mg/g。炒制温度为 330 °C 时鞣质含量最高, 因此选取 330 °C 为最佳。

2.3.2 炒制时间对栀子炭炮制工艺的影响 取栀子碎块 5 份, 每份 100 g, 置炒药机内, 在温度为 330 °C 下分别炒制 4、5、6、7、8 min, 取出晾凉, 即得栀子炭饮片。将制备好的栀子炭按照“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 然后按照“2.2.3”项下方法测定鞣质质量分数分别为 2.374、2.734、2.987、2.213、1.075 mg/g。炒制时间为 6 min 时鞣质质量分数最高, 因此选取 6 min 为最佳。

2.4 响应曲面试验法优化栀子炒炭炮制工艺

2.4.1 试验设计与结果 根据单因素实验结果, 选择炒制温度 (A)、炒制时间 (B) 2 个因素作为响应变量, 利用 Design Expert 8.0.6 软件按照中心组合 (复合) 设计 (CCD) 原理, 以栀子炭中鞣质含量 (Y) 为响应值, 通过响应面分析进行炮制工艺的优化, 得到栀子炭最优炮制条件, 因素水平及响应面试验设计与结果见表 2。

2.4.2 试验分析 由三维的立体模型图以及实验结果得到的相应的 2 次方程模型: 鞣质含量 = $3.14 - 0.019 A - 0.067 B - 0.19 AB - 0.50 A^2 - 0.38 B^2$ 。 $r^2 = 0.9259$, 说明该模型能解释 92.59% 响应值的变化, 因此该模型的拟合程度较好, 试验误差小, 可以用此模型进行分析和预测。响应面结果的方差分

析见表 3, 各因素对于栀子炭中鞣质质量分数的影响大小为炒制时间 > 炒制温度。

表 2 因素水平、响应面试验设计及结果

Table 2 Factor level, response interview design, and results

试验号	A/°C	B/min	Y/(mg·g ⁻¹)
1	330.00 (0)	6.00 (0)	2.893
2	310.00 (-1)	7.00 (+1)	2.409
3	330.00	6.00	3.235
4	350.00 (+1)	5.00 (-1)	2.290
5	330.00	6.00	3.194
6	310.00	5.00	2.060
7	330.00	6.00	3.167
8	350.00	7.00	1.870
9	301.72	6.00	2.186
10	330.00	7.41	2.323
11	330.00	4.59	2.650
12	330.00	6.00	3.221
13	358.28	6.00	2.295

表 3 方差分析

Table 3 Variance analysis

来源	平方和	自由度	离差平方和	F 值	P 值
模型	2.640	5	0.530	17.480	0.000 8**
A	2.997×10^{-3}	1	2.997×10^{-3}	0.099	0.761 8
B	0.036	1	0.036	1.180	0.313 6
AB	0.150	1	0.150	4.900	0.062 5
A ²	1.760	1	1.760	58.160	0.000 1**
B ²	1.000	1	1.000	33.160	0.000 7**
残差	0.210	7	0.030		
失拟项	0.130	3	0.044	2.180	0.233 2
纯误差	0.080	4	0.020		
总和	2.850	12			

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

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

2.4.3 响应面试验结果 根据所得模型绘制炒制温度、炒制时间的交互作用对栀子炭炮制工艺影响的 3D 响应面图见图 2。由 Design-Expert 8.0.6 优化处理得到最佳栀子炭炮制工艺参数为炒制温度为 329.94 °C, 炒制时间为 5.91 min, 预测鞣质质量分数为 3.145 mg/g。

2.4.4 工艺结果验证 根据软件得出最优结果, 结合实际操作, 将栀子炭炮制最佳工艺调整为炒制温度为 330 °C, 炒制时间为 5.91 min, 按此工艺条件重复 3 次实验, 结果 3 次实验鞣质质量分数分别为 3.153、3.046、3.160 mg/g, 得到鞣质平均质量分数为 3.120 mg/g, 与预测值相接近, 说明利用响应面法对炮制工艺拟合效果较好。

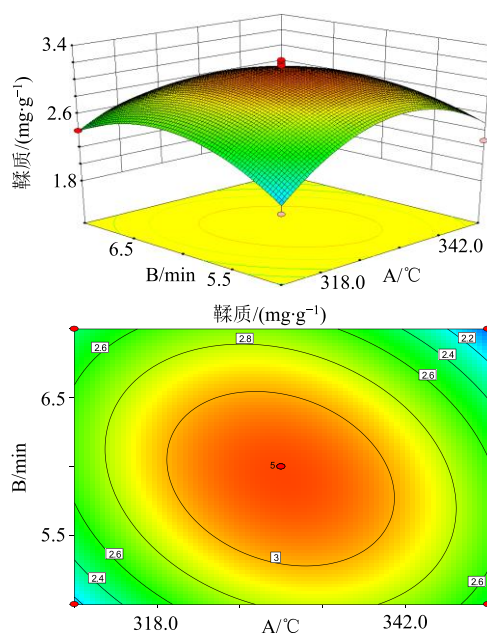


图 2 栀子炭炒制温度与炒制时间对鞣质含量的影响

Fig. 2 Effect of frying temperature and time on tannin content of *G. jasminoides* carbon

2.5 最优工艺炮制栀子炭的药效学实验验证

2.5.1 样品制备 按照响应面法优化得出的最佳工艺炮制栀子炭, 即得新法炮制样品; 取栀子生品碎块适量, 置炒制容器内, 用武火加热, 炒至黑褐色, 喷淋少许清水熄灭火星, 取出晾干^[17], 即得传统法炮制样品。分别取新法炮制栀子炭样品、传统炮制栀子炭样品和同批次栀子生品饮片制备成生药质量浓度为 1 g/mL 的水煎液备用。

2.5.2 分组与给药^[18] 取雄性昆明种小鼠 48 只,

表 4 各组小鼠凝血时间、APTT、PT、TT 比较 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 4 Comparison of coagulation time, APTT, PT, and TT in mice of each group ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	凝血时间/s	APTT/s	PT/s	TT/s
空白	—	223.33 ± 83.67	24.06 ± 5.47	8.87 ± 0.50	16.64 ± 1.17
新法炮制	0.18	80.00 ± 33.54***	19.74 ± 1.80*	8.93 ± 0.28	15.96 ± 0.61
传统炮制	0.18	116.67 ± 58.95**	21.09 ± 1.62	9.08 ± 1.38	16.52 ± 1.05
生品	0.18	150.00 ± 67.08*	24.43 ± 4.07	8.55 ± 0.47	16.68 ± 1.06

与空白组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs blank control group

3 讨论

中药炮制是一门传统的制药技术, 目前多数中药的炮制原理尚未阐明, 炮制工艺大多延续古法, 故对中药炮制工艺研究的深度和广度受到很大影响。目前, 热分析技术已开始应用于中药炮制研究领域^[19-20], 本实验参照有关文献对栀子总环烯醚萜类、总黄酮类和总有机酸类等样品进行制备, 并采用热分析技术模拟其热解过程, 虽然总环烯醚萜类

随机分为 4 组: 空白组、新法炮制组、传统炮制组、生品组, 每天 ig 给药 1 次, 给药剂量为生栀子组 0.018 g/g、新法炮制组 0.018 g/g、传统炮制组 0.018 g/g, 连续给药 3 d。

2.5.3 凝血时间测定 于末次给药 1 h 后, 摘眼球采血, 丢弃第 1 滴血, 然后在洁净载玻片滴 1 滴直径 8 mm 左右的血滴, 开始计时, 每隔 30 s 用大头针从血滴边缘向中间轻挑 1 次, 直至能挑起丝状纤维蛋白停止, 即为凝血时间。

2.5.4 APTT、PT、TT 测定 于末次给药后 1 h 后, 摘眼球取血, 弃去第 1 滴血, 取 0.9 mL 血液加入含 0.1 mL 3.8% 枸橼酸钠的 Eppendorf 管中, 混合均匀, 3 000 r/min 离心 15 min, 收集上层血浆, 在 2 h 内血凝仪测定内/外源性凝血功能指标 (APTT、PT、TT)。

2.5.5 统计学方法 采用 SPSS 22.0 统计软件进行数据分析, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2.5.6 对凝血时间的影响 与空白组比较, 新法炮制组、传统炮制组均能极显著缩短小鼠凝血时间 ($P < 0.01$), 生品组能显著缩短小鼠凝血时间 ($P < 0.05$), 新法炮制组效果好于传统炮制组, 但 2 组比较无明显差异, 结果见表 4。

2.5.7 对小鼠 APTT、PT、TT 的影响 与空白组比较, 新法炮制组可以显著缩短小鼠 APTT ($P < 0.05$), 传统炮制组和生品组差异不显著, 传统炮制组仅有缩短趋势, 2 组相比无明显差异; 与空白组比较, 对于小鼠 PT、TT 的作用, 新法炮制组、传统炮制组和生品组均无明显差异, 结果见表 4。

和总黄酮类提取物制备工艺类似, 但热分析实验结果发现温度升高到 200 °C 左右时, 栀子总环烯醚萜类和总黄酮类样品均首次出现较大热失重速率峰, 但前者明显高于后者。关于国内炭药止血原理的研究, 大多认为炭药止血可能与炒炭后鞣质、Ca²⁺、炭素含量增加或与其他成分的产生有关^[21-23], 根据相关研究报道^[24-26]多数药材炒炭后鞣质含量增加, 如茜草、茅根、地榆、藕节等炒炭后鞣质含量增加

2~4 倍, 鞣质类成分耐热性能良好, 故本实验选择鞣质含量为工艺优化指标, 研究过程中除了测定栀子炭样品中鞣质含量, 同时也对同批次栀子生品鞣质含量进行测定, 鞣质质量分数为 2.263 mg/g, 含量低于大部分炒炭样品。

本研究对最优工艺下炮制的栀子炭样品进行止血药效验证, 结果表明栀子炭新法炮制品和传统炮制品与生品相比均能显著缩短小鼠凝血时间, 原因可能是生品中也含有鞣质类成分和其他止血物质, 只是含量低于栀子炭。从实验数据看, 各组对小鼠 APTT、PT、TT 的影响差异不是很明显, 新法炮制组可以缩短小鼠 APTT, 差异也是仅具有统计学意义。分析原因可能是栀子炭单味药止血作用与传统止血药地榆、茜草等相比差很多, 也可能并不局限于止血, 因此后续可以采用其他药效模型进行研究, 从凉血止血角度, 建立血热出血模型^[27], 进一步揭示栀子炭炮制机制。

规范中药饮片及其炮制品生产工艺以及制定相关质量标准是中药可持续发展的基础。运用热分析技术和响应面法相结合优化中药炮制工艺, 量化火力火候参数, 并进行相关药效验证, 使研究更加客观化、具体化、数字化。与传统炮制相比, 新法炮制工艺炮制出的样品质量稳定, 利于质量标准的建立。结合新的技术, 揭示炮制机制, 改进炮制工艺, 为今后将研究成果应用于中药饮片实际生产中提供可靠的理论依据。

参考文献

- [1] 孙星衍, 孙冯翼. 神农本草经 [M]. 太原: 山西科学技术出版社, 2018.
- [2] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [3] Yin F, Liu J H. Research and application progress of *Gardenia jasminoides* [J]. *Chin Herb Med*, 2018, 10(4): 362-370.
- [4] 张雪, 李晓庆, 王云, 等. 焦栀子炒制过程中 HPLC 图谱变化与外观颜色的动态关联研究 [J]. *中草药*, 2018, 49(17): 4029-4037.
- [5] 吕辰子, 张晓燕, 王勃, 等. 栀子炮制的现代研究进展 [J]. *药物评价研究*, 2019, 42(6): 1245-1249.
- [6] 陈修远. 时方妙用·时方歌括·景岳新方砭·十药神书注解 [M]. 太原: 山西科学技术出版社, 2013.
- [7] 余丹丹, 郭瑞光. 等温滴定量热技术在药物研究中的应用 [J]. *中草药*, 2018, 49(22): 5463-5467.
- [8] 杨云汉, 赵雪秋, 杜瑶, 等. 长春胺与羟丙基- β -环糊精包合物的制备、表征及理论研究 [J]. *中草药*, 2019, 50(2): 352-363.
- [9] 孟祥龙, 郭晓慧, 张朔生, 等. 基于 TG-DTG 的祖师麻甘草制的炮制机制研究 [J]. *中国中药杂志*, 2012, 37(23): 3558-3563.
- [10] 何美菁, 吕辰子, 王勃, 等. 基于热分析技术的甘草制甘遂的炮制机制研究 [J]. *中国中药杂志*, 2018, 43(21): 4255-4263.
- [11] Ma J N, Meng X L, Guo X H, *et al.* Thermal analysis during partial carbonizing process of rhubarb, moutan and burnet [J]. *PLoS One*, 2017, 12(3): e0173946.
- [12] 史永平, 孔浩天, 李昊楠, 等. 栀子的化学成分、药理作用研究进展及质量标志物预测分析 [J]. *中草药*, 2019, 50(2): 281-289.
- [13] 雷敬卫, 王艳慧, 龚海燕, 等. Box-Behnken 效应曲面法优选栀子总环烯醚萜苷的提取工艺 [J]. *中医学报*, 2018, 33(10): 1987-1991.
- [14] 雷黎明, 蒋云凯, 李立荣. 正交法优选板蓝根总有机酸的提取工艺条件 [J]. *中国医药导报*, 2007, 4(28): 93-94.
- [15] 刘艳清, 汪洪武, 蔡璇, 等. 响应面法优化栀子总黄酮提取工艺研究 [J]. *中药材*, 2014, 37(2): 333-337.
- [16] 黄潇, 刘婧, 付小梅, 等. 基于 CRITIC 法计算权重系数的 Box-Behnken 响应面法优化栀子炭微波炮制工艺研究 [J]. *中草药*, 2017, 48(6): 1133-1138.
- [17] 龚千锋. 中药炮制学 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2016.
- [18] 张向阳, 贾丽霞, 李海涛, 等. 地榆烘法制炭前后止血作用比较 [J]. *药物评价研究*, 2017, 40(6): 788-791.
- [19] Meng X L, Guo X H, Cui N N, *et al.* Pyrolysis characteristics of *Radix Rhizoma Rhei*, *Cortex Moudan Radicis*, and *Radix Sanguisorbae* and correlations with the carbonizing process of Chinese herbs [J]. *Chin J Nat Med*, 2014, 12(1): 55-64.
- [20] Meng X L, He M J, Guo R, *et al.* Investigation of the effect of the degree of processing of *Radix Rehmanniae Preparata* (Shu Dihuang) on Shu Dihuangtan carbonization preparation technology [J]. *Molecules*, 2017, doi: 10.3390/molecules22071193.
- [21] 龚跃新, 何启章, 骆美玲, 等. 20 味中药炒炭前后的鞣质含量测定 [J]. *中国中药杂志*, 1991, 16(11): 664-665.
- [22] 王永泉, 于冰露. 中药制炭品作用原理浅析 [J]. *实用中医药杂志*, 2001, 17(7): 46.
- [23] 杨海玲, 黄冬芳, 农海妮, 等. 广山楂炒炭前后化学成分含量及止血作用研究 [J]. *中药药理与临床*, 2018, 34(6): 129-133.
- [24] 陈新玉, 李健和, 黎银波, 等. 地榆、地榆片、地榆炭的质量标准研究 [J]. *中国医药导报*, 2011, 8(17): 84-86.
- [25] 连晓晓, 胡昌江, 余凌英, 等. 藕节“炒炭存性”标准的研究 [J]. *中成药*, 2010, 32(9): 1545-1548.
- [26] 和颖颖. 白茅根炭品的止血机理及质量标准研究 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2009.
- [27] 潘玲玲, 刘婧, 黄潇, 等. 栀子炭的凉血止血作用及其炮制机制分析 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(23): 1-6.