

侧柏叶“炒炭存性”科学内涵初探

石典花^{1,2}, 戴衍朋¹, 苏本正¹, 孙立立¹, 张学兰^{2*}, 张 军^{1*}

1. 山东省中医药研究院, 山东 济南 250014

2. 山东中医药大学, 山东 济南 250355

摘要: **目的** 对侧柏叶“炒炭存性”科学内涵进行探讨。**方法** 采用 HPLC 特征图谱法对侧柏叶和不同炒制程度侧柏炭化学成分进行比较研究, 并对色谱峰进行归属; 采用体外止血和抑制斑马鱼脑出血实验对侧柏叶、不同炒制程度侧柏炭及炒炭前后特征变化成分进行止血药效比较研究。**结果** 不同炒炭程度对侧柏叶化学成分的影响不一, 炒炭适中时侧柏叶原有杨梅苷、槲皮苷、异槲皮苷、穗花杉双黄酮、扁柏双黄酮等黄酮类成分炒炭后明显降低了, 新产生的槲皮素和山柰酚量较高。体外止血实验表明, 与空白组相比炒适中炭的活化部分凝血活酶时间 (APTT) 和纤维蛋白原 (FIB) 均具极显著性差异 ($P < 0.01$), 凝血酶时间 (TT) 具显著性差异 ($P < 0.05$), 质量浓度为 50 $\mu\text{g/mL}$ 的炒适中炭即具有明显抑制斑马鱼脑出血作用 ($P < 0.01$), 且止血作用的增强与炒炭后新产生的槲皮素和山柰酚明显相关。**结论** 侧柏叶炒炭后化学成分发生了明显的变化, 增强了止血药效作用, 且两者均与炮制程度相关, 研究结果初步解析了炭药传统炮制要求“炒炭存性”的科学内涵, 为炭药传统炮制理论研究提供了一定的思路。

关键词: 侧柏叶; 侧柏炭; 炒炭存性; 科学内涵; 止血作用; 杨梅苷; 槲皮苷; 异槲皮苷; 穗花杉双黄酮; 扁柏双黄酮; 槲皮素; 山柰酚

中图分类号: R283.6

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2020)23-5963-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.23.008

Primary study on scientific connotation “carbonizing retains characteristics” of *Platycladi Cacumen*

SHI Dian-hua^{1,2}, DAI Yan-peng¹, SU Ben-zheng¹, SUN Li-li¹, ZHANG Xue-lan², ZHANG Jun¹

1. Shandong Academy of Chinese Medicine, Jinan 250014, China

2. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China

Abstract: **Objective** To study the scientific connotation “carbonizing retains characteristics” of *Platycladi Cacumen* (PC). **Methods** Chemical constituents of PC and *Platycladi Cacumen Carbonisata* (PCC) of different carbonizing degree were compared by HPLC characteristic chromatogram, and the chromatographic peaks were assigned; PC and PCC of different carbonizing degree and the characteristic components changed before and after being carbonized were used to compare the impact to hemostasis *in vitro* and inhibition of zebrafish cerebral hemorrhage. **Results** Chemical compositions of PC were affected by different carbonizing degree, when carbonizing degree is moderate, the content of myricitrin, quercitroside, isoquercitroside, amentoflavone and hinokiflavone original in PC were significantly reduced and the amount of quercetin and kaempferol which were newly produced were higher. *In vitro* hemostatic experiments showed that compared with the blank group, the APTT and FIB of PC which was carbonized moderately were significantly different ($P < 0.01$) and TT was significantly different ($P < 0.05$). It also had obvious inhibition effect on zebrafish cerebral hemorrhage when the concentration of PC carbonized moderately was 50 $\mu\text{g/mL}$ ($P < 0.01$).

收稿日期: 2020-07-06

基金项目: 全国中药特色技术传承人才培养项目 (2019); 科技基础性工作专项分项目 (2014FY111100); 国家中医药管理局中药炮制技术传承基地建设项目; 山东省中医药科技发展计划 (2015-173); 山东省中医药科技发展计划 (2017-130); 山东省职业教育技艺技能传承创新平台项目 (201712)

作者简介: 石典花, 博士, 副研究员。Tel: (0531)82949829 E-mail: shidianhua81@163.com

***通信作者** 张学兰 (1963—), 女, 教授, 博士生导师, 主要从事中药饮片制备技术及质量控制研究。

Tel: (0531)89628081 E-mail: zhang8832440@sina.com

张 军 (1979—), 男, 副研究员, 主要从事中药炮制研究。Tel: (0531)82949800 E-mail: sdzyybg@sina.com

The enhanced hemostasis was significantly related to newly produced compositions quercetin and kaempferol. **Conclusion** Chemical compositions of PC changed significantly after being carbonized and the hemostatic effect was enhanced, which were related to the processing degree. The scientific connotation and traditional processing requirements of “carbonizing retains characteristics” was preliminarily analyzed when the carbon medicine was processed by this study, which provides a certain idea for the research on traditional processing theory of carbon medicine.

Key words: *Platycladi Cacumen*; *Platycladi Cacumen Carbonisata*; carbonizing retains characteristics; scientific connotation; hemostatic efficacy; myricitrin; quercitrin; isoquercitrin; amentoflavone; hinokiflavone; quercetin; kaempferol

明代陈嘉谟在《本草蒙筌》中系统总结的炮制理论中指出“凡药制造，贵在适中，不及则功效难求，太过则气味反失……”，强调了中药炮制程度的重要性。中药炭药炮制传统理论要求“炒炭存性”，是指药物在炒炭时只能使其部分炭化，但不能灰化，未炭化部分仍应保存药物的固有气味。但目前市售炭药大部分存在炮制过重的问题^[1-2]，如何采用现代语言解析传统炮制理论“炒炭存性”的科学性，以及如何有效提升炭药质量，是炭药研究亟需解决的问题。

侧柏叶 (*Platycladi Cacumen*, PC) 是临床常用止血中药，始载于《神农本草经》，为柏科植物侧柏 *Platycladus orientalis* (L.) Franco 的枝梢及叶。多在夏、秋二季采收，阴干。其气清香，味苦涩，归肺、肝、脾经，具有凉血止血、化痰止咳、生发乌发的功效^[3]。侧柏叶经炒炭后，寒凉之性趋于平和，专于收涩止血，常用于热邪不盛的各种出血证^[4-5]。本研究以侧柏叶及其炮制品为研究对象，采用 HPLC 特征指纹图谱法对侧柏叶和不同炒制程度侧柏炭化学成分进行比较研究，探讨侧柏叶炒炭过程中化学成分的变化规律，同时采用体外止血和抑制斑马鱼脑出血实验对侧柏叶、不同炒制程度侧柏炭及炒炭前后变化特征成分槲皮苷、槲皮素和山柰酚进行止血药效作用比较研究^[6-7]，探讨不同炒制程度对侧柏叶止血药效的影响，并对侧柏叶炒炭前后化学成分和止血药效进行关联分析，同时结合前期研究对侧柏叶炒炭前后的化学成分变化过程进行推断，通过文献研究对侧柏叶炒炭后寒凉之性减弱进行解析，研究结果可为初步解析侧柏炭“炒炭存性”科学内涵提供数据支持，亦为解析传统炭药炮制理论提供一定的参考和思路。

1 仪器与试药

1.1 仪器

e2695 高效液相色谱仪，美国 Waters 公司，含 2996 型二极管阵列检测器；Mettler XS205DU 十万分之一电子天平，梅特勒-托利多仪器上海有限公

司；LC-350A 型超声波中药处理机，济宁市中区鲁超仪器厂；HZS-H 水浴振荡器，哈尔滨东联电子技术有限公司；XN06 系列血液凝聚仪，武汉景川诊断技术有限公司；S21 水浴锅，上海医疗器械五厂；TDL-40B 型离心机，上海安亭科学仪器厂；X51 型倒置显微镜，日本 Olympus 公司；Forma 3111 型水套式 CO₂ 培养箱，美国 Forma 公司；斑马鱼养殖饲养设备，北京爱生科技公司；SPX-280B-G 型博讯光照培养箱，上海基星生物科技有限公司。

1.2 试药

杨梅苷、异槲皮苷、槲皮苷、穗花杉双黄酮对照品，成都普瑞法科技开发有限公司，批号分别为 PRF8031443、PRF8030703、16022001、PRF7122043，质量分数均大于 98%；槲皮素对照品，中国食品药品检定研究院，批号 0081-9304；山柰酚对照品，上海中药标准化研究中心，批号 05-2005；扁柏双黄酮对照品，成都瑞芬思生物科技有限公司，批号 B-051-160222，质量分数大于 98%。

活化部分凝血活酶时间 (APTT) 试剂盒、凝血酶时间 (TT) 试剂盒、凝血酶原时间 (PT) 试剂盒、纤维蛋白原 (FIB) 试剂盒，武汉中泰生物技术有限公司，批号分别为 318121、518104、219012、618103；二甲亚砜 (DMSO)，天津市光下科技发展有限公司，批号 20171125；维生素 K1 注射液，遂成药业股份有限公司，批号 61812181；斑马鱼为山东省科学院生物所斑马鱼药物筛选平台提供；辛伐他丁，MCE 公司，批号 BCCB7519；丹参素，阿拉丁公司，批号 C1819220。

不同炒制程度侧柏炭为自采侧柏叶 (济南南山)，阴干后，在相同加热温度不同加热时间制备，并由山东省知名炮制专家姜保生老药工进行鉴定，分别为表面黑褐色、断面焦黄色的炒适中侧柏炭，表面棕褐色、断面浅焦黄色的炒轻侧柏炭和表面黑黑色、断面黑褐色的炒重侧柏炭。3 批侧柏叶采自济南燕子山、南山及临沂东山，阴干；侧柏炭为上述侧柏叶，按照实验室确定的最佳工艺制备^[1]。

2 方法与结果

2.1 HPLC 特征指纹图谱法测定炒炭对侧柏叶化学成分的影响

2.1.1 色谱条件 色谱柱为 Agilent SB C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-0.1%磷酸水溶液, 梯度洗脱: 0~30 min, 10%~20%乙腈; 30~50 min, 20%~40%乙腈; 50~70 min, 40%~55%乙腈; 70~75 min, 55%~100%乙腈; 75~85 min, 100%乙腈; 体积流量 1 mL/min; 检测波长 355 nm; 进样量 5 μL; 柱温 30 ℃。

2.1.2 供试品溶液的制备 取侧柏叶和不同炒制程度侧柏炭粉末各 1 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 加甲醇 25 mL, 称定质量, 超声处理 (功率 300 W, 频率 45 kHz) 30 min, 放冷, 再称定质量, 用甲醇补足减失质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 用微孔滤膜 (0.45 μm) 滤过, 即得供试品溶液。

2.1.3 混合对照品溶液的制备 精密称取杨梅苷、异槲皮苷、槲皮苷、槲皮素、山柰酚、穗花杉双黄酮、扁柏双黄酮对照品适量, 加甲醇溶解, 制成混合对照品溶液。

2.1.4 方法学考察

(1) 精密度试验: 精密吸取侧柏炭 (炒适中炭) 供试品溶液 5 μL, 按“2.1.1”项色谱条件连续进样 6 次, 结果测得样品的各主要色谱峰的相对保留时间 RSD<0.2%, 相对峰面积 RSD<5%, 表明仪器精密度良好。

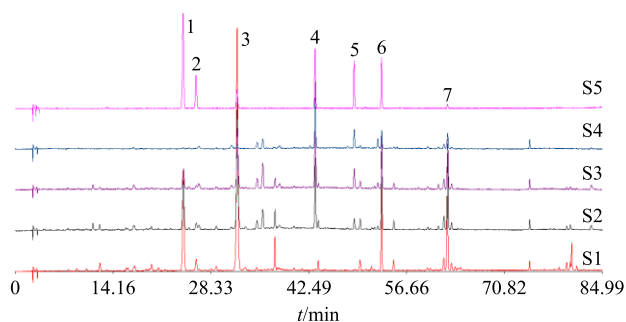
(2) 稳定性试验: 精密吸取侧柏炭 (炒适中炭) 供试品溶液 5 μL, 按“2.1.1”项色谱条件分别于 0、2、4、8、12、24 h 进样测定, 结果测得样品中各主要色谱峰的相对保留时间 RSD<0.3%, 相对峰面积 RSD<5%, 表明供试品溶液稳定性良好。

(3) 重复性试验: 取侧柏炭 (炒适中炭) 供试

品 5 份, 按“2.1.2”项方法制备成供试品溶液, 按“2.1.1”项色谱条件进样, 结果测得各样品的主要色谱峰的相对保留时间 RSD<0.3%, 相对峰面积的 RSD<5%, 表明方法重复性良好。

2.1.5 侧柏叶和不同炒制程度侧柏炭 HPLC 图谱测定 分别精密吸取对照品溶液和供试品溶液各 5 μL, 注入液相色谱仪, 测定, 结果见图 1。侧柏叶炒炭后化学成分发生了较为明显的变化, 且随着炮制程度的加深, 对各个色谱峰的影响不一, 具体情况见表 1。与对照品图谱比对, 共辨识出杨梅苷、异槲皮苷、槲皮苷、槲皮素、山柰酚 7 种黄酮类成分。已辨识出成分的色彩峰变化情况见表 2。

2.1.6 侧柏叶和炒适中侧柏炭 HPLC 特征图谱比较 为进一步确认炒炭适中对侧柏叶化学成分的影响, 对 3 批侧柏叶及其制备的侧柏炭进行测定, 两者的



S1-侧柏叶 S2-侧柏炭 (轻) S3-侧柏炭 (适中) S4-侧柏炭 (重) S5-混合对照品 1-杨梅苷 2-异槲皮苷 3-槲皮苷 4-槲皮素 5-山柰酚 6-穗花杉双黄酮 7-扁柏双黄酮

S1-PC S2-PCC (lighter degree) S3-PCC (moderate degree) S4-PCC (heavier degree) S5-mixed reference substance 1-myricitrin 2-isoquercitrin 3-quercitrin 4-quercetin 5-kaempferol 6-amentoflavone 7-hinokiflavone

图 1 侧柏叶及不同炒制程度侧柏炭 HPLC 特征图谱
Fig. 1 HPLC specific chromatogram of PC and PCC of different processing degree

表 1 侧柏叶炒炭过程中色谱峰变化情况

Table 1 Chromatographic peak changes of PC during being carbonized

色谱峰变化情况	色谱峰个数	具体分析
共有色谱峰 (四者共有)	5	2 个色谱峰面积先增加后降低; 3 个逐渐降低
消失	15	仅生品检测到
新产生	4	生品中无, 其他侧柏炭样品均检测到
逐渐降低至炒重变为零	8	生品、炒轻、适中逐渐降低, 炒重后消失
逐渐降低至炒适中变为零	9	生品、炒轻逐渐降低, 炒适中、炒重后消失
先产生炒重后消失	6	生品未有, 仅炒轻、炒适中出现, 炒重后消失
先增加后消失	1	生品、炒轻、适中逐渐增加, 炒重后消失
合计	48	

表 2 侧柏叶及不同炒制程度侧柏炭辨识的 7 种成分峰面积

Table 2 Seven identified components peak areas of PC and PCC of different processing degrees

成分	t_R/min	峰面积			
		侧柏叶	侧柏炭 (轻)	侧柏炭 (适中)	侧柏炭 (重)
杨梅苷	24.36	732 170	360 504	149 428	0
异槲皮苷	26.23	75 467	45 411	12 043	0
槲皮苷	32.17	1 811 897	952 916	437 415	0
槲皮素	43.46	0	352 958	516 823	250 961
山柰酚	49.11	0	57 638	105 435	95 026
穗花杉双黄酮	53.07	354 254	356 177	237 790	78 724
扁柏双黄酮	62.63	406 569	416 171	280 394	93 111

特征图谱分别见图 2、3。为较明显比较两者色谱峰差异, 将其特征图谱的进行镜像比对, 结果见图 4。

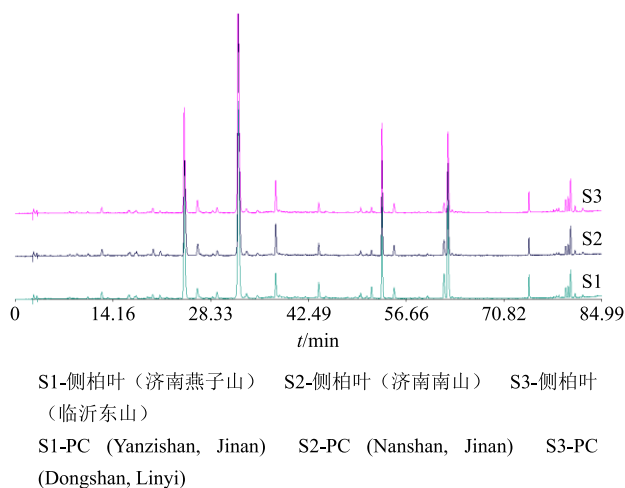


图 2 3 批侧柏叶 HPLC 特征图谱叠加图

Fig. 2 HPLC specific chromatogram overlayed chart of three batches of PC

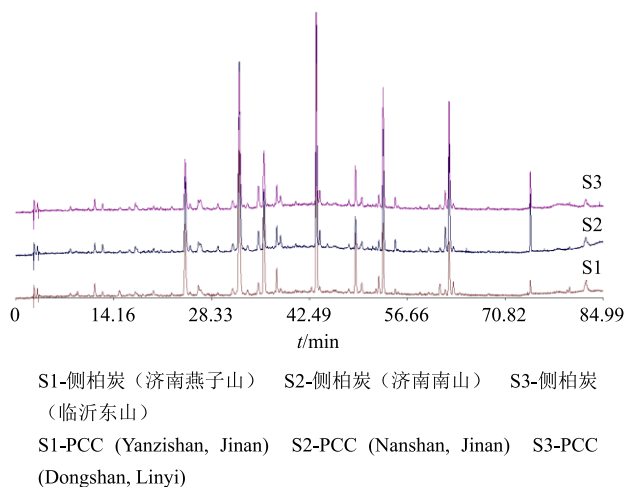


图 3 3 批侧柏炭 HPLC 特征图谱叠加图

Fig. 3 HPLC specific chromatogram overlayed chart of three batches of PCC

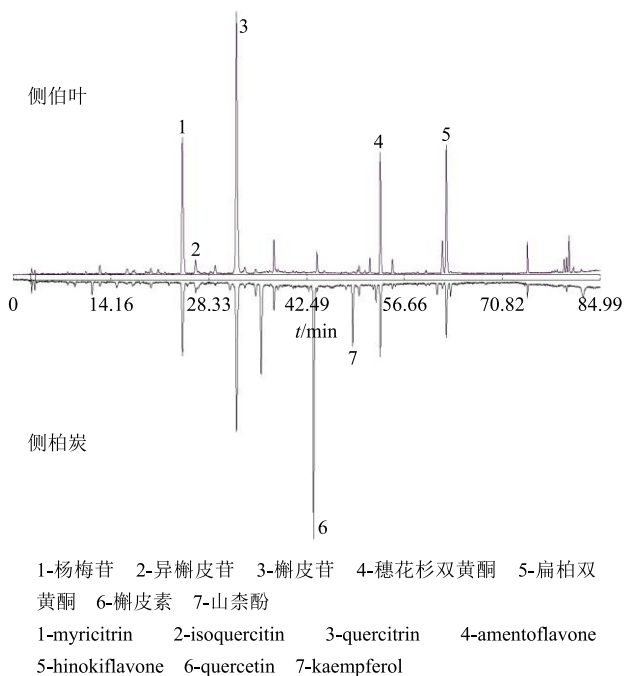


图 4 侧柏叶-侧柏炭镜像图

Fig. 4 Mirror image of PC and PCC

结果辨识出的 7 种黄酮类成分变化与上述测定结果一致。

2.2 侧柏叶、不同炒制程度侧柏炭及特征变化成分体外止血作用研究

2.2.1 血浆样本的制备 将健康人静脉血置于含有 0.109 mol/L 柠檬酸钠抗凝液的塑料管中, 其比例为 9:1, 轻轻颠倒使其充分混匀, 以 3 000 r/min 离心 15 min, 分离出上层贫血小板血浆, 即为待测血浆。血浆应在 2 h 内进行测定, 如不能在此时间内完成检测, 应将血浆低温保存 (-20°C 保存 2 周, -70°C 保存 6 个月), 测定前将待测血浆于 37°C 下快速融化后使用。

2.2.2 对照品溶液的制备 精密移取维生素 K1 注

射液, 稀释成 0.01 g/mL, 即得。分别精密称取槲皮素、槲皮苷和山柰酚对照品适量, 于具塞锥形瓶中, 加少量 DMSO 溶解, 加蒸馏水制成 1 mg/mL 的对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备 分别取侧柏叶和不同炒制程度侧柏炭粉末(过 4 号筛) 5 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 加 15 倍量蒸馏水, 超声处理(功率 300 W, 频率 45 kHz) 1 h, 滤过, 浓缩, 定容至 50 mL 量瓶中。

2.2.4 凝血指标测定

(1) APTT 的测定: 冻干品 APTT 试剂按瓶签标示装量, 准确量取蒸馏水进行溶解, 轻摇混匀后室温静置 15 min 即可使用; 0.025 mol/L CaCl_2 37 °C 孵育 3 min; 取待测血浆 50 μL , 分别加入 50 μL 侧柏叶和不同炒制程度侧柏炭提取液、槲皮素、槲皮苷和山柰酚对照品溶液, 阳性对照组加 50 μL 维生素 K1, 2 组对照组分别加 50 μL 蒸馏水和适量 DMSO; 加 APTT 试剂 50 μL , 混匀, 37 °C 温育 5 min; 加入 CaCl_2 50 μL , 混匀计时, 记录血液凝固时间, 结果见表 3、4。

(2) PT 的测定: 冻干品试剂 PT 试剂按瓶签标示装量, 准确量取复溶液进行溶解, 轻摇混匀后室温静置 15 min 即可使用, 使用前预温至 37 °C; 取待测血浆 50 μL , 加入样品的方法同上述 APTT 的

测定, 混匀, 37 °C 温育 3 min; 加入 PT 试剂 100 μL , 混匀计时, 记录血液凝固时间, 结果见表 3、4。

(3) TT 的测定: 冻干品 TT 试剂按瓶签标示装量, 准确量取复溶液进行溶解, 轻摇混匀后室温静置 15 min 即可使用; 取待测血浆 100 μL , 加入样品的方法同上述 APTT 的测定, 混匀, 37 °C 温育 3 min; 加入 TT 试剂 100 μL , 混匀计时, 记录血液凝固时间, 结果见表 3、4。

(4) FIB 的测定: 冻干品 FIB 试剂按瓶签标示装量, 准确量取蒸馏水进行溶解, 轻摇混匀后室温静置 15 min 即可使用; 将待测血浆用咪唑缓冲溶液 10 倍稀释; 取待测稀释血浆 100 μL , 加入样品的方法同上述 APTT 的测定, 混匀, 37 °C 水浴孵育 3 min; 加入 FIB 凝血酶试剂 100 μL , 混匀计时, 记录其血液凝固时间, 结果见表 3、4。

(5) 凝血指标测定结果: 与对照组比较, 阳性对照组可极显著缩短 APTT 和 PT ($P < 0.01$), 极显著增加 FIB ($P < 0.01$); 炒适中炭的 APTT 极显著缩短 ($P < 0.01$), 炒重炭的 APTT 也显著缩短 ($P < 0.05$); 侧柏叶及不同炒制程度侧柏炭的 TT 差异没有统计学意义; 除侧柏叶外, 不同炒制程度侧柏炭的 PT 均显著缩短 ($P < 0.05$); 侧柏叶和不同炒制程度侧柏炭的 FIB 均显著增加 ($P < 0.05$ 、0.01)。

与对照组相比, 槲皮素和山柰酚均能极显著缩

表 3 侧柏叶及不同炒制程度侧柏炭对凝血 4 项药理指标的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

Table 3 Influence on four pharmacological indexes of blood coagulation of PC and PCC of different processing degrees ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

组别	$\rho/(\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	APTT/s	TT/s	PT/s	FIB/($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)
对照	—	42.95 ± 2.69	11.30 ± 0.32	14.60 ± 0.53	2.88 ± 0.16
维生素 K1	0.01	21.25 ± 0.21 ^{##}	13.55 ± 0.19	10.98 ± 1.05 ^{##}	4.54 ± 0.16 ^{##}
侧柏叶	1	> 120	11.18 ± 0.53	14.08 ± 0.62	4.02 ± 0.50 ^{##}
侧柏炭(轻)	1	> 120	11.03 ± 0.73	12.95 ± 0.82 [#]	3.84 ± 0.26 ^{##}
侧柏炭(适中)	1	21.30 ± 0.37 ^{##}	11.55 ± 0.13	13.40 ± 0.42 [#]	3.88 ± 0.72 ^{##}
侧柏炭(重)	1	39.30 ± 0.37 [#]	11.25 ± 0.29	13.60 ± 0.47 [#]	3.58 ± 0.23 [#]

与对照组比较: [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$, 下表同

[#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ vs control group, same as below

表 4 槲皮素、槲皮苷和山柰酚对凝血 4 项药理指标的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

Table 4 Influence on four pharmacological indexes of blood coagulation of quercetin, kaempferol and quercitrin ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

组别	$\rho/(\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1})$	APTT/s	TT/s	PT/s	FIB/($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)
对照	—	46.55 ± 1.35	13.88 ± 0.30	15.85 ± 0.59	2.45 ± 0.22
槲皮素	1	37.50 ± 1.55 ^{##}	13.75 ± 0.15	13.85 ± 0.18 ^{##}	3.38 ± 0.12 ^{##}
槲皮苷	1	46.40 ± 0.41	13.70 ± 0.51	14.33 ± 0.33 ^{##}	3.14 ± 0.19 ^{##}
山柰酚	1	41.65 ± 1.03 ^{##}	13.70 ± 0.34	13.08 ± 0.33 ^{##}	2.58 ± 0.29

短 APTT ($P < 0.01$), 槲皮苷对 APTT 无明显影响; 槲皮素、槲皮苷和山柰酚对 TT 均无明显影响; 三者的 PT 均极显著缩短 ($P < 0.01$); 槲皮素和槲皮苷均能极显著增加 FIB ($P < 0.01$), 而山柰酚对 FIB 无明显影响。

2.3 侧柏叶、不同炒制程度侧柏炭及特征变化成分抑制斑马鱼脑出血研究

2.3.1 斑马鱼胚胎获取 ♀♂斑马鱼分开喂养, 照明 14 h/黑暗 10 h 交替进行, 定时喂以人工颗粒状饵料和刚孵出的卤虫无节幼体 *Artemia nauplii*。采卵时取健康性成熟的斑马鱼按♀♂1:1 的比例放入交配缸内, 次日 9:00~10:00 时获得受精卵。对受精卵进行消毒和洗涤后移入斑马鱼胚胎培养用水(含 5.0 mmol/L NaCl、0.17 mmol/L KCl、0.4 mmol/L CaCl₂、0.16 mmol/L MgSO₄) 中, 28 °C 下控光培养。

2.3.2 供试品溶液的制备 侧柏叶及不同炒制程度侧柏炭的提取方法同“2.2.3”项, 滤过后浓缩至干浸膏, 备用; 槲皮苷、槲皮素和山柰酚溶液制备方法同“2.2.2”项。

2.3.3 抑制斑马鱼脑出血比较研究 因抑制斑马鱼脑出血实验未有研究基础, 故先采用侧柏炭(适中)进行预实验, 结果利用辛伐他丁成功建立斑

马鱼脑出血模型, 50、100 μg/mL 侧柏炭提取物可有效抑制辛伐他丁诱导的斑马鱼脑部出血, 基于此对侧柏叶及不同炒制程度侧柏炭进行抑制斑马鱼脑出血实验。同时为进一步探究侧柏叶炒炭前后抑制斑马鱼脑出血活性成分, 对侧柏叶炒炭前后变化的特征成分槲皮苷(明显降低)、槲皮素(新产生)、山柰酚(新产生)进行研究。

2.3.4 侧柏叶及不同炒制程度侧柏炭止血效果评价 在受精卵发育 24 h 时, 使用 1.0 mg/mL 链酶蛋白酶 E 溶液脱去卵膜。在体视显微镜下挑选正常斑马鱼胚胎, 移入 6 孔培养板中, 每孔 30 枚。分别加入不同质量浓度的侧柏叶及不同炒制程度侧柏炭提取物(25、50、100 μg/mL), 阳性药(丹参素 50 μg/mL)和造模药(1 μmol/L 的辛伐他丁)。同时加入苯硫脲(PTU)抑制黑色素形成, 加盖, 置光照培养箱(28 °C)让胚胎继续发育。在受精后 48 h 时, 取 20 尾斑马鱼在显微镜观察, 统计脑部出血斑马鱼尾数, 重复实验 3 次。

脑出血减少率计算公式为出血改善率=(模型组脑出血尾数-给药组脑出血尾数)/(模型组脑出血尾数-对照组脑出血尾数)。结果图 5 和表 5。

由结果可见, 与模型组相比较, 50、100 μg/mL

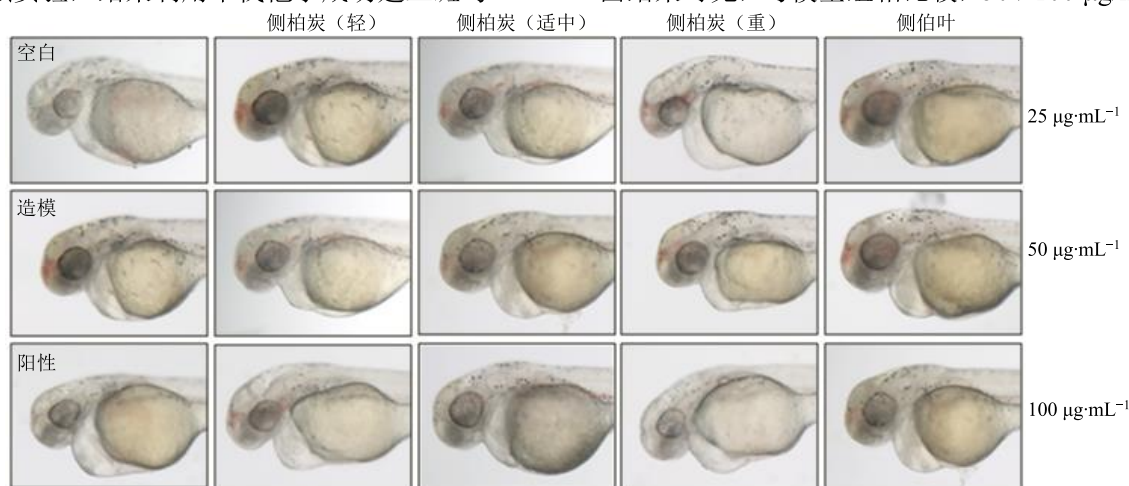


图 5 侧柏叶及不同炒制程度侧柏炭水提取物对斑马鱼脑出血的影响

Fig. 5 Effect on cerebral hemorrhage in zebrafish of water extract of PC and PCC of different processing degrees

的炒适中炭、100 μg/mL 的炒重炭及 100 μg/mL 侧柏叶提取物均具有明显抑制斑马鱼脑出血活性 ($P < 0.01$)。总体看来抑制斑马鱼脑出血活性效果为侧柏炭(适中) > 侧柏炭(重) = 侧柏叶生品 > 侧柏炭(轻)。

2.3.5 侧柏叶炒炭前后变化特征成分止血效果评价 在受精卵发育 24 h 时, 使用 1.0 mg/mL 链酶蛋白酶

E 溶液脱去卵膜。在体视显微镜下挑选正常的斑马鱼胚胎, 移入 6 孔培养板中, 每孔 30 枚。分别加入槲皮苷、槲皮素、山柰酚化合物(1、5、10 μg/mL), 其他操作同上, 结果见图 6 和表 5。

结果可见, 10 μg/mL 的槲皮苷, 5、10 μg/mL 的山柰酚具有抑制斑马鱼脑出血活性, 抑制斑马鱼脑出血活性效果山柰酚 > 槲皮苷 > 槲皮素。

表 5 侧柏叶、不同炒制程度侧柏炭及炒炭前后变化特征成分抑制斑马鱼脑出血统计结果 ($\bar{x} \pm s, n = 20$)Table 5 Statistical results of inhibiting cerebral hemorrhage in zebrafish of PC, PCC of different processing degrees and characteristic components of PC changed before and after being carbonized ($\bar{x} \pm s, n = 20$)

组别	$\rho/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	脑出血率/%	组别	$\rho/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	脑出血率/%
对照	—	$1.67 \pm 2.87^{**}$	侧柏炭 (重)	25	76.67 ± 2.89
模型	—	$85.00 \pm 5.00^{##}$		50	73.33 ± 7.64
阳性对照	50	$41.67 \pm 7.64^{**}$		100	$61.67 \pm 7.64^{**}$
侧柏叶	25	80.00 ± 5.00	槲皮苷	1	80.00 ± 5.00
	50	76.67 ± 2.87		5	75.00 ± 5.00
	100	$61.67 \pm 7.64^{**}$		10	$63.33 \pm 2.89^{**}$
侧柏炭 (轻)	25	81.67 ± 2.89	槲皮素	1	75.00 ± 5.00
	50	58.33 ± 2.89		5	75.00 ± 5.00
	100	71.67 ± 2.89		10	80.00 ± 5.00
侧柏炭 (适中)	25	70.00 ± 5.00	山柰酚	1	78.33 ± 7.64
	50	$60.00 \pm 5.00^{**}$		5	$68.33 \pm 2.89^{*}$
	100	$46.67 \pm 7.64^{**}$		10	$61.67 \pm 2.89^{**}$

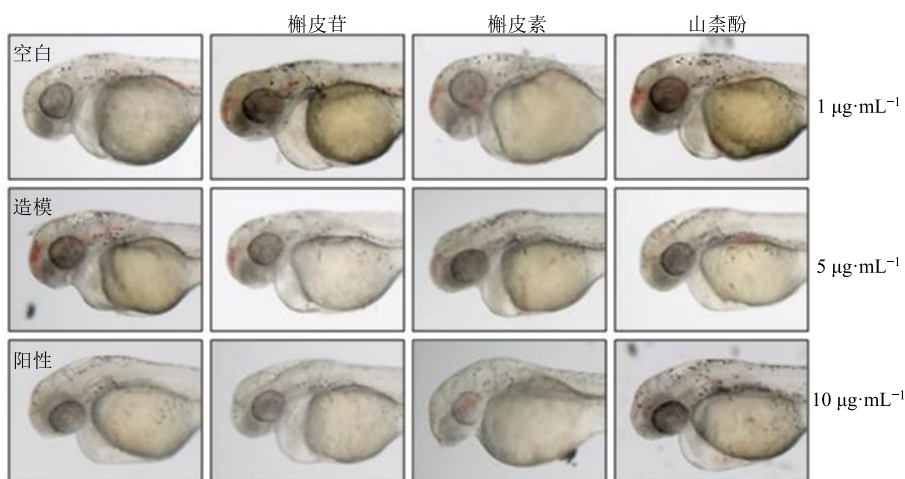
与对照组比较: $^{##}P < 0.01$; 与模型组比较: $^{**}P < 0.01$ $^{##}P < 0.01$ vs control group; $^{**}P < 0.01$ vs model group

图 6 侧柏叶炒炭前后特征变化成分对斑马鱼脑出血的影响

Fig. 6 Effect on cerebral hemorrhage in zebrafish of characteristic components of PC changed before and after being carbonized

3 讨论

3.1 炒炭对侧柏叶化学成分的影响

侧柏叶炒炭过程中共计 48 个色谱峰发生较为明显的变化, 通过色谱峰归属明确了 7 个黄酮类成分的具体变化情况, 其中 1 号峰 (杨梅苷)、2 号峰 (异槲皮苷)、3 号峰 (槲皮苷)、6 号峰 (穗花杉双黄酮)、7 号峰 (扁柏双黄酮) 炒炭后明显降低, 且随着炮制程度的加重逐渐降低, 1~3 号峰在炮制重炭时甚至消失了; 4 号峰 (槲皮素) 和 5 号峰 (山柰酚) 是侧柏叶炒炭后新产生的成分。

进一步分析发现, 杨梅苷、异槲皮苷、槲皮苷、

穗花杉双黄酮、扁柏双黄酮 5 种成分为侧柏叶本身含有成分, 但加热对 5 种成分影响不一, 经比较发现, 杨梅苷、异槲皮苷、槲皮苷 3 种成分对热较敏感, 随着炮制程度的加重逐渐降低, 直至消失殆尽。而穗花杉双黄酮、扁柏双黄酮 2 种成分在加热程度较低时并未有变化, 但随着加热程度的加重, 炒至适中炭时两者的量才明显降低, 但当炒重时两者并未消失殆尽, 说明两者对加热的敏感度相对较低。槲皮素和山柰酚为炒炭后新产生的成分, 且随着加热程度的加深, 出现先增加后降低的趋势, 即炒适中炭时两者的量相对较高。根据上述研究, 从主要

活性成分黄酮类成分变化角度来看^[8-9], 炒适中炭时, 以杨梅苷、异槲皮苷、槲皮苷、穗花杉双黄酮、扁柏双黄酮等为代表的侧柏叶中原有黄酮类化学成分虽降低了, 但仍然存在, 说明其“存性”了, 而以槲皮素和山柰酚为代表的黄酮类成分的出现说明其“炒炭”了, 且此时槲皮素和山柰酚量达到最高值, 因此从化学成分变化角度认为炒适中侧柏炭为“炒炭存性”的最佳状态。

3.2 炒炭对侧柏叶止血作用的影响

体外止血实验研究证实, 综合止血效果以炒适中侧柏炭作用最佳。为进一步探求原因, 对炒炭前后变化的特征成分进行止血作用研究, 结果槲皮素和山柰酚均能极显著缩短 APTT 和 PT 值, 且槲皮素能极显著增加 FIB 含量, 而槲皮苷不能明显缩短 APTT 值, 只能极显著缩短 PT 值和增加 FIB 含量, 说明侧柏炭止血作用增强与槲皮素和山柰酚的增加相关。通过对侧柏叶及不同炒炭程度侧柏炭抑制斑马鱼脑出血活性比较研究发现侧柏炭(适中)效果较好, 质量浓度为 50 $\mu\text{g/mL}$ 时即表现出较为显著的止血效果。对侧柏叶炒炭后减少的槲皮苷, 以及新产生的槲皮素、山柰酚进行了抑制斑马鱼脑出血活性研究, 结果发现, 10 $\mu\text{g/mL}$ 的槲皮苷, 5、10 $\mu\text{g/mL}$ 的山柰酚具有抑制斑马鱼脑出血的活性, 而槲皮素未表现出明显抑制斑马鱼脑出血活性。

根据上述研究, 从止血药效作用方面来看, 炒适中侧柏炭的体外止血和抑制斑马鱼脑出血作用均较其他炒制程度侧柏炭效果佳, 且该结果与炒炭前后的主要变化特征成分槲皮苷、槲皮素和山柰酚明显相关。

3.3 炒炭对侧柏叶寒凉之性的影响

查阅相关文献发现, 侧柏叶炒炭后明确减少成分中槲皮苷具有镇静、降血压、抗炎镇痛、抗肿瘤、抗氧化、抗病毒等药理作用^[10], 异槲皮苷具有降压、抗炎、抗氧化、抗癌等药理作用^[11]; 杨梅苷具有改善微循环、抗炎、抗氧化及抑制细胞凋亡等药理活性^[12], 穗花杉双黄酮具有抗炎、抗氧化、保护血管和神经、降糖及抗肿瘤等药理作用^[13]。扁柏双黄酮具有抗炎、抗肿瘤等药理活性^[14-15], 参考相关文献, 寒凉类药物具有镇静、解热、消炎、抗菌、降血压等作用^[16-19], 因此侧柏叶炒炭后黄酮苷类和双黄酮类成分的降低与其寒凉之性减弱明显相关。由此说明侧柏叶炒炭后止血作用增强, 寒凉之性减弱。

基于本研究及前期研究结果, 认为侧柏叶炒炭

后新产生的槲皮素和山柰酚成分为其增强止血作用的物质, 关联分析侧柏叶炒炭后黄酮苷类及双黄酮类成分的降低, 推测炒炭过程中槲皮素和山柰酚的转化途径主要是黄酮苷类成分受热脱掉糖(如槲皮苷、异槲皮苷、槲皮素-3-O-阿拉伯糖苷、槲皮素-3-D-木糖苷脱掉糖生成槲皮素, 山柰酚-7-O-葡萄糖苷脱糖生成山柰酚)或者双黄酮类受热裂解(如扁柏双黄酮、穗花双黄酮受热裂解生成山柰酚)^[20-22]。

综合上述研究, 对侧柏叶“炒炭存性”科学内涵进行初步探讨, 认为侧柏叶“炒炭”应具备 3 个主要特征: ①炒炭后外观色泽和气味应发生明显的改变, 与药典标准“表面黑褐色, 质脆, 易折断, 断面焦黄色。气香, 味微苦涩。”一致; ②炒炭后内在化学成分应发生明显的变化, 应产生炒炭标志物槲皮素和山柰酚等黄酮苷元类成分; ③炒炭后其止血作用活性应增强。“存性”即“保留原有药物的性味”亦应具备 3 个主要特征: ①炒炭后应保留原有基本外形, 与药典标准中“本品形如侧柏叶”一致; ②炒炭后应保留原有的止血作用功效, 该结果与侧柏叶及槲皮苷体外止血实验和抑制斑马鱼脑出血实验中具有止血活性结果一致; ③炒炭后寒凉之性应减弱, 但不能消失, 侧柏叶中所含槲皮苷、异槲皮苷、杨梅苷、穗花杉双黄酮、扁柏双黄酮等黄酮类成分均与侧柏叶的寒凉之性相关, 炒炭后上述成分均明显降低, 故可使其寒凉之性趋于缓和。

此外, 侧柏叶炒炭前后功效的变化还与其所含其他物质如鞣质类、挥发油类及钙离子、炭素等物质的变化情况相关, 下一步研究中将逐步纳入并进行考证。

参考文献

- [1] 石典花, 宗珊珊, 王 军, 等. 基于市售侧柏炭饮片质量问题探讨其“炒炭存性”的质控标准 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(3): 21-26.
- [2] 石典花, 戴衍朋, 宗珊珊, 等. 侧柏炭饮片质控标准提升研究 [J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(9): 4038-4042.
- [3] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [4] 肖永庆, 李 丽. 中华医学百科全书·中药炮制学 [M]. 北京: 中国协和医科大学出版社, 2016.
- [5] 刘 晨, 柳 佳, 张 丽, 等. 侧柏叶炮制前后对血热复合出血模型大鼠的止血作用比较 [J]. 中草药, 2014, 45(5): 668-672.
- [6] 李 潇, 朱长乐, 赵 宁, 等. 健脾益气摄血方及其拆方对辛伐他汀诱导斑马鱼脑出血的防治作用研究 [J]. 北京中医药大学学报, 2017, 40(12): 1004-1010.

- [7] 周忠焱, 徐佳琪, 赵外荣, 等. 斑马鱼脑出血模型的建立及丹参在该模型上改善脑出血的研究 [J]. 中华中医药学刊, 2017, 35(5): 1121-1125.
- [8] 刘晨, 柳佳, 郑传柱, 等. 侧柏炭止血作用活性部位筛选 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(16): 3152-3156.
- [9] 薛露, 刘晨, 丁安伟, 等. 侧柏炭黄酮类成分群对干酵母致血热复合出血模型大鼠的止血作用研究 [J]. 中国医院药学杂志, 2016, 36(17): 1486-1491.
- [10] 杨琳. 槲皮苷药理活性研究进展 [J]. 亚太传统医药, 2015, 11(6): 61-63.
- [11] Xie W Y, Wang M, Chen C, *et al.* Hepatoprotective effect of isoquercitrin against acetaminophen-induced liver injury [J]. *Life Sci*, 2016, 152: 180-189.
- [12] Domitrović R, Rashed K, Cvijanović O, *et al.* Myricitrin exhibits antioxidant, anti-inflammatory and antifibrotic activity in carbon tetrachloride-intoxicated mice [J]. *Chem Biol Interact*, 2015, 230: 21-29.
- [13] 金旭东, 卢轩, 王惠国, 等. 卷柏属植物化学成分及其药理作用研究进展 [J]. 时珍国医国药, 2018, 29(4): 959-963.
- [14] Shim S Y, Lee S G, Lee M. Biflavonoids isolated from *Selaginella tamariscina* and their anti-inflammatory activities via ERK 1/2 signaling [J]. *Molecules*, 2018, 23(4): 926.
- [15] 穆婉, 程学芳, 张雪, 等. 扁柏双黄酮对肝细胞癌 HepG2 细胞增殖和凋亡的影响 [J]. 中南药学, 2019, 17(3): 399-404.
- [16] 胡爱萍. 关于中药药性理论现代化研究的思考 [J]. 光明中医, 2006, 21(10): 20-22.
- [17] 肖开, 苗明三. 药性寒的特点及现代研究 [J]. 中医学报, 2013, 28(7): 1006-1008.
- [18] 刘群, 杨晓农. 中药四气五味的现代认识 [J]. 西南民族大学学报: 自然科学版, 2006, 32(5): 981-985.
- [19] 任雪梅, 杨光福. 中药药性理论之四气研究进展 [J]. 医学研究与教育, 2009, 26(5): 89-91.
- [20] 吴鹏, 李慧芬, 张学兰, 等. 炒炭对荷叶主要化学成分转化机制的研究 [J]. 中成药, 2015, 37(8): 1767-1770.
- [21] 李慧芬, 崔伟亮, 张学兰. 荷叶炮制前后 4 种黄酮类成分含量变化 [J]. 时珍国医国药, 2014, 25(1): 89-91.
- [22] 孙立立, 杨书斌, 江波, 等. 炮制对侧柏叶化学成分的影响 [J]. 中成药, 2006, 28(6): 821-823.