

基于“炒炭存性”理论研究炮制工艺对地榆抑菌功效的影响

顾薇^{1,2,3}, 姚俊宏^{1,4}, 陆梦梦², 苏曼⁵, 邹俊清², 蔡徐艺², 赵宏宇⁶, 宋金云⁶, 葛畅⁷, 李健², 童黄锦^{8*}, 陈军^{1,2*}

1. 南京中医药大学江苏省中医外用开发与应用工程研究中心, 江苏 南京 210023

2. 南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210023

3. 江苏省中药炮制重点实验室, 江苏 南京 210023

4. 南京中医药大学实验动物中心, 江苏 南京 210023

5. 连云港市食品药品检验检测中心, 江苏 连云港 222000

6. 南京中医药大学附属南京医院(南京市第二医院)临床科研中心, 江苏 南京 210009

7. 南京中医药大学第一临床医学院, 江苏 南京 210023

8. 南京中医药大学附属中西医结合医院药学部, 江苏 南京 210028

摘要:目的 从药效与灰化 2 个角度阐释“炒炭存性”原理, 并优选地榆炒炭工艺及探讨炮制质量标志物(quality marker, Q-Marker)与灰化临界点参数。方法 考察炒炭温度、时间对地榆炮制品外观性状、提取物得率、指标性成分、金黄色葡萄球菌抑制效果的影响, 以此优选炮制工艺。结果 随炒炭程度增加, 地榆炭提取物中没食子酸含量先增后减, 鞣花酸一直增加。地榆在抗菌效果方面炮制增效, 从而阐释“炒炭存性”; 地榆炭对金黄色葡萄球菌的抑菌效果与提取物中没食子酸的含量呈较强正向相关性。地榆炭提取物得率与提取物中鞣花酸含量呈极强的反向相关性($r=-0.964\ 03$), 地榆炭提取物得率突然下降时, 饮片质地开始出现脆化、灰化现象。获得的最优地榆炒炭工艺: 在 250 °C 温度条件下炒炭 6 min, 此时提取物得率约 30%, 没食子酸在提取物 $[(46.41 \pm 0.06) \mu\text{g}/\text{mg}]$ 和饮片中 $[(14.20 \pm 0.02) \mu\text{g}/\text{mg}]$ 含量相较于其他炮制条件最高。结论 提出用没食子酸含量指导地榆炒炭工艺, 用提取物得率控制灰化临界点的研究思路, 并优化了基于抑菌效应的地榆炮制工艺。

关键词: 地榆; 炮制; 炒炭存性; 抑菌; 质量标志物; 没食子酸; 鞣花酸; 药效; 灰化

中图分类号: R283.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)04-1042-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.04.010

Effect of processing technology on antibacterial effect of *Sanguisorbae Radix* based on theory of “maintaining medicinal properties after carbonisatus”

GU Wei^{1,2,3}, YAO Jun-hong^{1,4}, LU Meng-meng², SU Man⁵, ZOU Jun-qing², CAI Xu-yi², ZHAO Hong-yu⁶, SONG jin-yun⁶, GE Chang⁷, LI Jian², TONG Huang-jin⁸, CHEN jun^{1,2}

1. Jiangsu Provincial Engineering Research Center of TCM External Medication Development and Application, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

2. School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

3. Jiangsu Key Laboratory of Chinese Medicine Processing, Nanjing 210023, China

4. Laboratory Animal Center, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

5. Lianyungang Food and Drug Inspection and Testing Center, Lianyungang, Lianyungang 222000, China

6. Department of Clinical Research Center, The Second Hospital of Nanjing, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210009, China

7. The First Clinical Medical College, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

收稿日期: 2021-09-02

基金项目: 江苏省中医药科技发展计划青年基金项目(QN202005); 江苏省药学会—新培英基金项目(J2021002)

作者简介: 顾薇(1981—), 副教授, 博士, 主要从事中药炮制与制剂研究。Tel: 13584095898 E-mail: 6464966@qq.com

*通信作者: 童黄锦(1983—), 副主任药师, 博士, 主要从事中药质量控制及炮制机制研究。Tel: 13770330158 E-mail: hjtong62@126.com
陈军(1975—), 教授, 博士, 主要从事中药外用制剂研究。Tel: (025)85811611 E-mail: chenjun75@163.com

8. Department of Pharmacy, Affiliated Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210028, China

Abstract: Objective The theory of “Maintaining medicinal properties after carbonisatus (MMPC)” was explained from the perspectives of pharmacodynamics and ashing. Meanwhile, the processing method of carbonizing by stir-frying of *Sanguisorbae Radix* (SR) was optimized and the quality markers (Q-Marker) in processing as well as the parameters characterizing ashing critical point were discussed. **Methods** The effects of temperature and time of carbonizing by stir-frying on the appearance, yield, the index composition and inhibition on *Staphylococcus aureus* of Charred *Sanguisorbae Radix* (CSR) were investigated to optimize processing technology. **Results** The results showed that with the aggravation of processing degree, the content of gallic acid in CSR extract increased first and then decreased, while ellagic acid kept increasing. Antibacterial effect of CSR was confirmed to increase by processing, explaining the MMPC principle. Meanwhile, there was a strong and positive correlation between the bacteriostatic effects and the content of gallic acid in CSR extract. The yield of CSR extract and the ellagic acid content in extract showed a strong reverse correlation (correlation coefficient = $-0.964\ 03$). It was observed that when the yield of CSR extract suddenly declined, the texture of medicinal materials begun embrittling and ashing. Moreover, the best processing condition of CSR was obtained: SR was carbonized by stir-frying at the temperature of $250\ ^\circ\text{C}$ for 6 min. This moment, the extract yield was about 30% and the content of gallic acid reached the peak in both the extract [$(46.41 \pm 0.06)\ \mu\text{g}/\text{mg}$] and medicinal materials [$(14.20 \pm 0.02)\ \mu\text{g}/\text{mg}$]. The bacteriostatic effects of CSR were better than those of the raw SR. **Conclusion** In this study, the authors put forward the research idea of using gallic acid content in extract to guide the carbonizing by stir-frying technology of SR and controlling the critical point of ashing by the yield of extract, and optimize the processing technology of SR based on bacteriostatic effect.

Key words: *Sanguisorbae Radix*; processing; maintaining medicinal properties after carbonisatus; bacteriostatic effects; quality markers; gallic acid; ellagic acid; pharmacodynamics; ashing

地榆为蔷薇科地榆属植物地榆 *Sanguisorba officinalis* L.或长叶地榆 *S. officinalis* L. var. *longifolia* (Bert.) Yü et Li 的干燥根。地榆炭为地榆照炒炭法炮制所得的炮制品,其性微寒,味苦、酸、涩,归肝、大肠经,具凉血止血、解毒敛疮的功效^[1]。《中国药典》2020 年版对地榆炒炭程度的要求为“表面焦黑色、内部棕褐色”,尚无量化指标、炮制参数的限定,这就难以保证炭药质量的均一性和稳定性,经常出现同一种炭药的临床疗效或研究结果有差异甚至截然不同,如地榆炒炭后鞣质含量增加^[2-4]或减少^[5],能促进血液凝固的 Ca^{2+} 浓度增加^[6]或减少^[7],炒炭后止血作用增强^[3]或没有影响^[8]都有报道。由此,根据药效优化地榆炒炭工艺,建立药效相关炮制指标,为临床提供优质且稳定的地榆炭饮片成为了亟待解决的问题。

地榆炒炭能显著增强止血功效^[3],然而传统炮制理论要求“炒炭存性”,所存之性即为原药材的固有特性,现代研究表明地榆可用于治疗多种过敏性皮肤病^[9],具有抗炎、抗菌^[10]活性,其对金黄色葡萄球菌^[11-13]、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌^[14-16]、白色念珠菌^[11,13]、大肠杆菌^[11-13,17]、绿脓杆菌^[11]、铜绿假单胞菌^[12-13]、枯草芽孢杆菌^[12]、蜡状芽孢杆菌^[13]、红色毛癣菌^[18]、嗜水气单胞菌^[19]的抗菌活性在几

十味抗菌中药中处于前列,与公认的抑菌中药苦参相当或更优^[11,17]。同时,地榆具有极为广谱的抑菌谱^[10,15,20-29],包括对多种临床耐药菌株的抗菌活性^[14-16,30]。根据“炒炭存性”理论,地榆炭同样可能是一类广谱且显著的抗菌中药,但鲜有这方面的研究报道^[31]。

有研究指出地榆炭对大肠杆菌和痢疾杆菌的抑制作用强于生地榆^[32];课题组前期研究结果也表明,地榆炭对金黄色葡萄球菌、白色念珠菌、铜绿假单胞菌、红色毛癣菌均具显著的抑制作用,且优于生地榆^[18,33]。然而,地榆“炒炭存性”所存之性是否包括其优异的抗菌表现?为存性服务的炒炭工艺是什么?反映炮制工艺的质量标志物 (quality marker, Q-Marker) 是什么?同时,张仲景在《伤寒杂病论》中首次提出炭药“烧灰存性,勿令太过”,表明了中药制炭的限度,即要存性,“勿令太过”的限度如何体现?这些问题依然亟待解决。

基于此,本研究根据前期研究基础,选取在地榆中含量较高且炒炭过程中变化较大的没食子酸与鞣花酸作为指标性成分,以抑菌功效为导向,优化地榆炒炭工艺,包括炒炭时间与温度,初步探寻地榆炒炭程度的 Q-Marker,并对炒炭过程中的“存性”问题从药效和灰化 2 个上下限度提出思考。

1 仪器与材料

PTHW 型调温电热套, 南通市通州申通电热器厂; Waters 2695 型高效液相色谱仪, 沃特世科技(上海)有限公司; Hadera ODS-2 C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 江苏汉邦科技有限公司; TGL-16G 型高速离心机, 上海安亭科学仪器厂; MS105DU 型梅特勒-托利多电子分析天平, 瑞士 Mettler Toledo 公司; SB25-12DTD 型超声波清洗机, 南京以马内利仪器设备有限公司; SHZ-D (III) 型循环水式真空泵, 南京文尔仪器设备有限公司; RE-1000A 型旋转蒸发仪, 上海亚荣生化仪器厂; MSDC-5 型自动炒货机, 常州市金坛迈斯机械有限公司; Ultrospec 10 细胞密度仪, 美国哈佛仪器公司; BSC-1604 II A2 型生物安全柜, 苏州安泰空气技术有限公司; B6120 型培养箱, 赛默飞世尔科技公司; Epoch2 TC 型酶标仪, 美国伯腾仪器有限公司; DKZ-2 型电热恒温震荡水槽, 上海精宏实验设备有限公司。

地榆饮片(批号 20160240)购自于苏州市天灵中药饮片有限公司, 为蔷薇科地榆属植物地榆 *S. officinalis* L. 的干燥根, 由南京中医药大学药学院陆兔林教授鉴定, 符合《中国药典》2020 年版一部要求。金黄色葡萄球菌亚种 BNCC337371 购自北京北纳创联生物技术研究院。

哌拉西林钠他唑巴坦钠(批号 C11334141)购自上海麦克林生化科技有限公司; 对照品鞣花酸, 质量分数 96%, 批号 817C024, 购自四川省维克奇生物科技有限公司; 对照品没食子酸, 质量分数 99%, 批号 C1309C72105, 购自上海源叶生物科技有限公司; 11 cm 中速定性滤纸, 货号 92410432S, 购自国药集团化学试剂有限公司; 乙腈、甲酸为色谱纯, 购自德国默克公司。

2 方法与结果

2.1 HPLC 法测定地榆、地榆炭中没食子酸、鞣花酸含量

2.1.1 地榆、地榆炭供试品溶液的制备 精密称取地榆、地榆炭提取物(提取物制备方法见“2.2.2”项)3.75 mg, 溶于 3.75 mL 甲醇中, 12 000 r/min(离心半径 5.94 cm)离心 10 min 后, 观察有无沉淀, 若有沉淀, 继续加甲醇稀释至离心无沉淀, 记录甲醇用量, 备用。

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取没食子酸对照品 2.17 mg、鞣花酸对照品 2.03 mg, 分别置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 超声溶解, 制备成

含没食子酸 217 μg/mL、鞣花酸 203 μg/mL 的混合对照品溶液, 备用。

2.1.3 色谱条件 色谱柱为 Hadera C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-0.2%磷酸水溶液(20:80); 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长: 没食子酸为 272 nm, 鞣花酸为 254 nm; 进样量 10 μL; 图谱采集时间 16 min, 所得高效液相色谱图(图 1)中没食子酸和鞣花酸的理论塔板数分别为 40 900 和 16 300。

2.1.4 系统适用性考察 将“2.1.1”项下制备所得地榆、地榆炭供试品溶液按“2.1.3”项下色谱条件进行 HPLC 分析, HPLC 图见图 1, 结果可见地榆、地榆炭提取物中共存组分对没食子酸峰、鞣花酸峰无干扰, 分离度良好, 说明方法专属性良好。

2.1.5 线性关系考察 取“2.1.2”项下制备所得没食子酸、鞣花酸对照品溶液混合制成 100 μg/mL 的对照品混合溶液作为母液, 然后将母液用甲醇稀释得到 100、75、50、25、10、5、1 μg/mL 的对照品混合溶液, 按“2.1.3”项下条件进行高效液相色谱分析, 通过峰面积-浓度做标准曲线, 峰面积为纵坐标(y), 质量浓度为横坐标(x), 得到标准曲线分别为没食子 $y=2893x+2018$, $r=0.998$; 鞣花酸 $y=9857x+614.2$, $r=0.996$, 线性范围均为 1~100 μg/mL, 二者在标准曲线质量浓度范围内线性关系良好。

2.1.6 精密度考察 取地榆炭供试品溶液, 连续测定 6 次, 记录其峰面积并计算其 RSD 值, 结果没食子酸 RSD 为 1.35%, 鞣花酸 RSD 为 1.96%, 表明仪器精密度较好。

2.1.7 稳定性考察 取地榆炭供试品溶液, 在 24 h 内每隔 4 h 测定 1 次, 共测定 6 次, 记录其峰面积并计算其 RSD 值, 结果没食子酸 RSD 为 1.54%, 鞣花酸 RSD 为 0.59%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.1.8 重复性考察 连续制备 6 份相同质量浓度的地榆炭供试品溶液, 记录峰面积并计算没食子酸和鞣花酸的质量浓度, 结果没食子酸质量浓度为 (21.97 ± 0.84) μg/mL, RSD 为 3.84%, 鞣花酸质量浓度为 (64.26 ± 2.10) μg/mL, RSD 为 3.27%, 表明该方法重复性良好。

2.1.9 加样回收率考察 精密称取已测定没食子酸和鞣花酸含量的地榆炭样品 6 份, 每份 5 g, 分别加入没食子酸和鞣花酸对照品溶液适量(与样品中没食子酸和鞣花酸等量, 分别为 1 μg/mg 与 2.8 μg/mg),

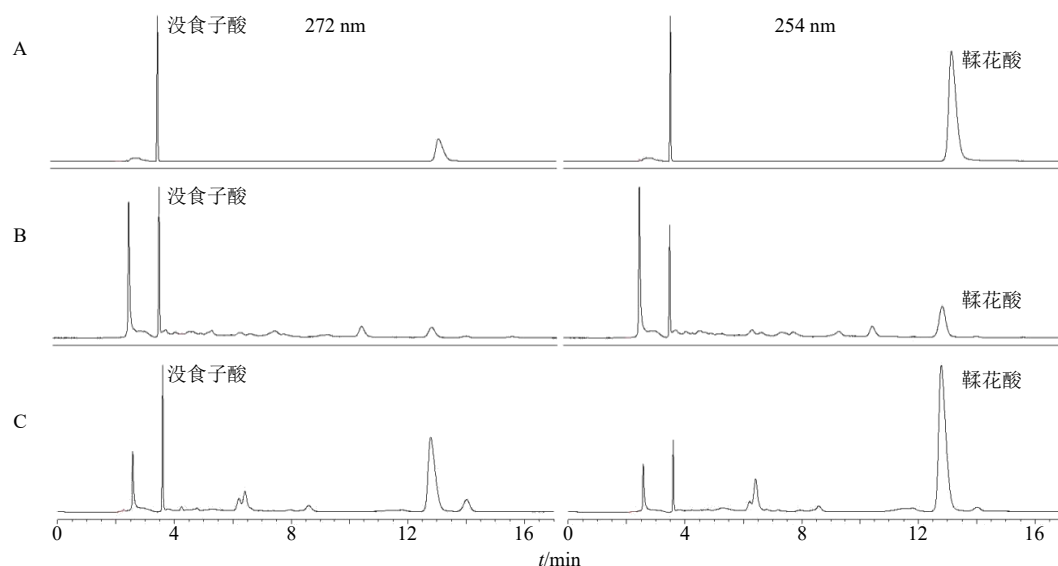


图 1 没食子酸和鞣花酸对照品 (A)、地榆提取物 (B)、地榆炭提取物 (C) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC of gallic acid and ellagic acid reference substance (A), *Sangisorbae Radix* extract (B), and *Charred Sangisorbae Radix* extract (C)

按“2.1.1”项下方法制备供试品溶液，测定峰面积并计算质量浓度，计算平均加样回收率及其 RSD，结果没食子酸和鞣花酸的平均加样回收率为 104.90%、96.04%，RSD 分别为 0.92%、0.82%。根据《中国药典》2020 年版通则 9101 药品质量标准分析方法验证指导原则要求，没食子酸、鞣花酸的加样回收率结果均在药典要求范围内。

2.2 地榆炒炭工艺的考察及提取物的制备

2.2.1 地榆炒炭工艺的考察 称取约 100 g 地榆，自动炒货机设置炒炭温度并预热至所需温度，加入饮片，设置炒炭时间，开始制炭，炒炭结束后即得地榆炭。

2.2.2 地榆、地榆炭提取物制备 称取地榆或地榆炭 100 g，放入粉碎机中粉碎成粉，过《中国药典》二号筛，筛下的粉末即为粗粉。称取粗粉约 5.0 g 置于 50 mL 的具塞锥形瓶中，加入 10 倍量的 75%乙醇，在 50 °C 条件下水浴 12 h，取出后 50 °C 超声 1 h，用 2 层滤纸抽滤，取滤液，用旋转蒸发仪在 50 °C 条件下蒸干溶剂后，放入烘箱中烘干，取出茄形瓶并刮出内壁上的物质，得地榆、地榆炭提取物，并按公式计算提取物得率。

提取物得率 = 提取物质量 / 粗粉质量

提取物用甲醇溶解并稀释至线性范围，按“2.1.3”项下色谱条件进行 HPLC 分析，计算地榆及其炮制品提取物中指标成分没食子酸和鞣花酸的含量，并按公式计算各成分在饮片中的含量。

成分在饮片中的含量 = 成分在提取物中的含量 × 提取物得率

2.2.3 总鞣质含量测定 参照《中国药典》2020 年版通则 2202 项下“鞣质含量测定法”测定总鞣质含量。

2.3 炒炭温度对地榆不同炮制品性状及指标性成分的影响

2.3.1 炒炭温度对地榆不同炮制品性状的影响 炭药的普遍受其炒制程度影响，炒炭温度与炒炭时间为关键参数。将地榆按“2.2.1”项下方法炒制，为单因素考察，炒炭时间统一设置 8 min，考察不同炒炭温度 (210~310 °C) 对饮片性状和指标性成分没食子酸、鞣花酸含量的影响。

外观性状结果 (图 2 和表 1) 可知，随着炒炭温度的升高，地榆炭表面颜色与内部颜色均逐渐加深，到 270、290 °C 时接近《中国药典》2020 年版中所述的“表面焦黑色、内部焦褐色”，而 290 °C 时饮片质地显脆，干燥易折断；至 310 °C 时出现明显的炭化现象，质地疏松且脆，干燥易折断。饮片粉末颜色同样呈现逐渐加深的现象，250~270 °C 时由焦黄色向焦褐色的突变，310 °C 时呈黑褐色。

同时对比饮片提取物得率 (表 2)，地榆不同炮制品提取物的得率随炒炭温度的增加而降低，290 °C 后低于生地榆，310 °C 时仅 (5.29 ± 0.77) %，这与饮片过度炭化有关，即炭化导致饮片质量的损失。由此可见，炒炭温度从 290 °C 开始质地显脆，饮片质量出现损失。

2.3.2 炒炭温度对地榆不同炮制品指标性成分的影响 表 2 中结果表明,随着炒炭温度的升高,提取物中没食子酸含量先升后降,250 °C 时达峰值,310 °C 时低于生地榆中含量;而鞣花酸含量一直上升,290 °C 时开始显著上升。同时,随着炒炭温度的增加,没食子酸和鞣花酸在饮片中含量均先增后减,其中没食子酸也在 250 °C 时达峰值,鞣花酸在 290 °C 时达峰值,之后迅速下降(表 2)。

综上,当设置炒炭时间 8 min,炒炭温度在 250~270 °C 时,地榆炭提取物与饮片中没食子酸和鞣花酸含量均较高,提取物得率较高,其中 270 °C 时的性状更符合《中国药典》2020 年版描述。

2.4 炒炭时间对地榆不同炮制品指标性成分的影响

根据“2.3”实验结果,选取没食子酸和鞣花酸含量均较高,提取物得率也较高的 250 °C 作为炒炭温度,将地榆按“2.2.1”项下方法炒制,考察不同

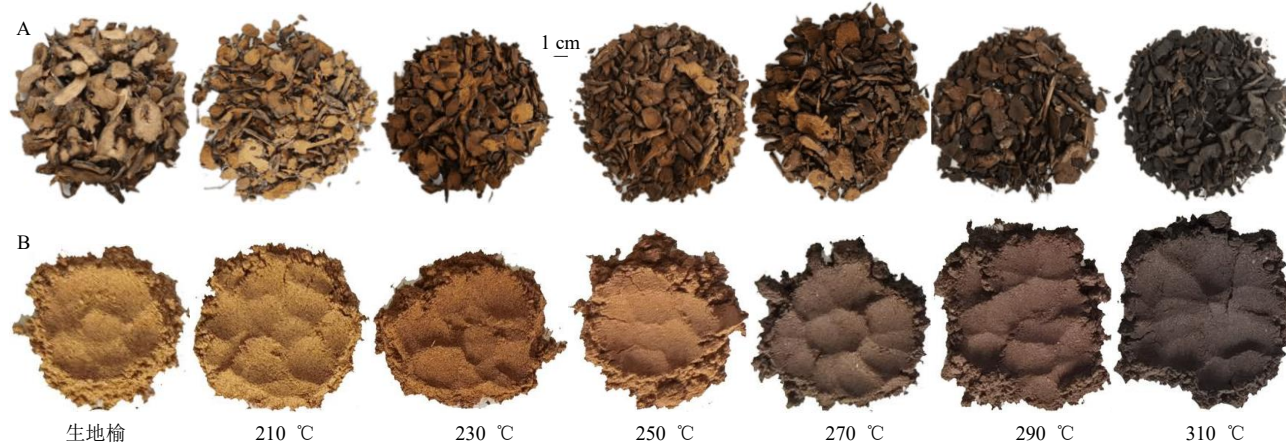


图 2 地榆生品及不同炒炭温度下炮制品的性状图 (A) 与粉末图 (B)

Fig. 2 Characteristic figure (A) and powder figure (B) of SR and CSR at different carbon stir-frying temperatures

表 1 地榆生品及不同炮制品外观与性状总结

Table 1 Summary of appearance and characteristics of SR and different CSR

样品	表面颜色	内部颜色	质地	粉末颜色
生地榆	浅棕色	棕白色	质地坚硬, 不易折断	土黄色
210 °C 8 min 炮制品	焦黄色	焦浅黄色	质地坚硬, 不易折断	土黄色
230 °C 8 min 炮制品	焦深黄色	焦黄色	质地坚硬, 干燥不易折断	焦黄色
250 °C 8 min 炮制品	焦褐色	焦浅褐色	质地较坚硬, 干燥不易折断	焦黄色
270 °C 8 min 炮制品	焦深褐色	焦褐色	质地较坚硬, 干燥不易折断	焦褐色
290 °C 8 min 炮制品	焦黑色	焦褐色	质地显脆, 干燥易折断	焦褐色
310 °C 8 min 炮制品	黑色	黑色	质地疏松且脆, 干燥易折断	黑色

表 2 地榆生品及不同炒炭温度下炮制品中没食子酸、鞣花酸含量变化及提取物得率变化 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Changes of gallic acid, ellagic acid contents and extraction yield of SR and CSR at different carbon stir-frying temperatures ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

样品	没食子酸/(mg·g ⁻¹)		鞣花酸/(mg·g ⁻¹)		提取物得率/%
	提取物中	饮片中	提取物中	饮片中	
生地榆	23.96±0.07	6.91±0.02	4.68±0.10	1.35±0.03	28.83±1.33
210 °C 8 min 炮制品	29.80±0.13	10.25±0.04	6.25±0.04	2.15±0.01	34.40±1.61
230 °C 8 min 炮制品	36.03±1.54	11.85±0.51	8.72±0.04	2.87±0.01	32.90±1.88
250 °C 8 min 炮制品	47.50±0.04	13.83±0.01	27.08±0.09	7.88±0.03	29.11±0.73
270 °C 8 min 炮制品	39.18±1.10	11.48±0.32	30.16±0.18	8.68±0.05	28.78±0.66
290 °C 8 min 炮制品	42.89±0.05	9.55±0.01	45.27±0.31	10.08±0.07	22.27±1.15
310 °C 8 min 炮制品	16.19±0.05	0.85±0.00	79.23±0.94	4.19±0.05	5.29±0.77

炒炭时间 (0~14 min) 对指标性成分没食子酸、鞣花酸含量的影响。表 3 中实验结果表明, 炒炭时间的影响与炒炭温度相类似, 提取物得率在 4~8 min 稳定在 30% 左右, 10 min 开始显著下降; 与表 2 相似, 提取物中没食子酸含量先增后减, 6 min 达峰值 [(46.41 ± 0.06) mg/g], 鞣花酸含量则一直增加,

最高达 [(95.11 ± 0.17) mg/g]; 与表 2 相似, 饮片 中没食子酸与鞣花酸含量均先增后减, 分别在 6 min [(14.20 ± 0.02) mg/g]、10 min [(12.73 ± 0.11) mg/g] 处达峰值, 之后快速下降。以上研究结果表明, 温度与时间 2 个炮制参数在控制地榆炮制程度时无明显差异性。

表 3 地榆生品及不同炒炭时间下炮制品中没食子酸、鞣花酸含量变化及提取物得率变化 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 Changes of gallic acid, ellagic acid contents and extraction yield of SR and CSR at different carbon stir-frying time ($\bar{x} \pm s, n=3$)

样品	没食子酸/(mg·g ⁻¹)		鞣花酸/(mg·g ⁻¹)		提取物得率/%
	提取物中	饮片中	提取物中	饮片中	
生地榆	23.96±0.07	6.91±0.02	4.68±0.10	1.35±0.03	28.83±1.33
4 min 炮制品	31.23±0.08	10.09±0.02	6.81±0.13	2.20±0.04	32.30±1.74
6 min 炮制品	46.41±0.06	14.20±0.02	17.76±0.06	5.43±0.02	30.59±0.56
8 min 炮制品	41.23±0.26	11.99±0.08	25.24±0.05	7.34±0.01	29.09±1.46
10 min 炮制品	36.77±0.17	5.08±0.02	92.05±0.81	12.73±0.11	13.83±0.88
12 min 炮制品	37.53±0.15	5.40±0.02	85.39±0.21	12.30±0.03	14.40±1.01
14 min 炮制品	19.49±0.07	1.18±0.00	95.11±0.17	5.76±0.01	6.06±0.61

2.5 相关性考察

实验数据录入 Excel 2016 软件进行分析, 应用 Correl、Pearson 相关系数评判 2 个变量之间的线性关系, 系数的变化范围为-1~1。值为 0 意味着 2 个变量之间没有线性关系, 绝对值越接近 1 代表 2 个变量之间线性关系越强。

炒炭温度 (表 2) 与炒炭时间 (表 3) 的考察结果观察到一个共性现象, 地榆炭提取物得率开始显著下降的点 (表 2 中 8 min, 290 °C 或表 3 中 10 min, 250 °C), 正是提取物中鞣花酸含量拐点式上升的点, 进而用“2.5”项下 CORREL 工作表函数计算提取物得率与提取物中成分含量 (表 2 与表 3) 的相关性, 结果见表 4, 可知, 提取物得率与鞣花酸含量相关性极强, 两者且呈反向关系, 提取物得率下降点即为鞣花酸含量迅速上升的拐点, 此为地榆过度炭化的临界点, 饮片质地开始脆化、灰化。

2.6 体外抗菌活性测定方法建立

2.6.1 菌悬液的配制 金黄色葡萄球菌选取生长良

表 4 提取物成分含量与提取物得率的相关系数

Table 4 Correlation coefficient between gallic acid and ellagic acid contents and yield of extract of SR/CSR

地榆及其炮制品	与提取物得率的相关系数	
	没食子酸含量	鞣花酸含量
8 min 炒炭时间, 不同炒炭温度下炮制品	0.524 167	-0.945 55
250 °C 炒炭温度, 不同炒炭时间下炮制品	0.406 262	-0.964 03

好的菌落于 1 mL 生理盐水中, 制成菌悬液浓度调至 0.5 个麦氏比浊标准。麦氏比浊法是一种用比浊来校对菌液浓度的方法, 根据美国临床和实验室标准协会 (clinical and laboratory standards institute, CLSI), 0.5 个麦氏比浊标准相当于 1.5×10^8 个菌/mL。
2.6.2 供试药液的制备 组别设置为测试组、空白组和阳性组。测试组为地榆、地榆炭提取物, 先溶解于二甲亚砜 (DMSO), 再配制成 51.2 mg/mL 母液, DMSO 终浓度 0.05%; 空白组为生理盐水; 阳性药为哌拉西林钠他唑巴坦钠, 先溶解于 DMSO, 再配制成 6.4 mg/mL 母液, DMSO 终浓度 0.05%, 备用。

2.6.3 最低抑制浓度 (minimum inhibitory concentration, MIC) 的测定 采用微量液基稀释法测定抑菌活性, 将供试药液在 96 孔板中梯度稀释, 得地榆、地榆炭工作液 51.2、25.6、12.8、6.4 mg/mL, 阳性药工作液 6.4、3.2、1.6、0.8 mg/mL; 每孔加入 2 μ L 工作液和 198 μ L 菌悬液, 置于 37 °C, 80% 湿度条件下, 静置培养 1 d 后, 以肉眼未见培养液浑浊的对应浓度定为 MIC 数值 (80% 生长受到抑制)。

2.6.4 抑菌圈试验 设置地榆、地榆炭提取物组 (20 mg/mL, 先溶于 DMSO, 再配制成 DMSO 终浓度为 0.05% 的药液)、阳性对照组 (5 mg/mL)、生理盐水组和溶剂对照组。无菌条件下, 取琼脂培养基加菌悬液 300 μ L, 涂布均匀, 吸出多余菌液, 放置片刻,

夹取直径 6 mm 的圆形纸片（预先经高压灭菌），展平，置于培养皿中（每皿 4 片），轻轻按压，吸取药液 10 μ L 滴加于纸片中央，盖上培养皿，做好标记，37 $^{\circ}$ C 培养，24 h 后观察并记录抑菌圈形态、颜色、澄明度与直径大小，每组 3 个平行样。

2.7 微量液基稀释法考察不同炮制程度对地榆炭抑菌效果的影响

将“2.4”项下所得炒炭温度统一设置 250 $^{\circ}$ C 时不同炒炭时间（0~14 min）的地榆炮制品，作为不同炮制程度的地榆炭样品，采用“2.6”项下考察其体外抗菌活性，并建立抗菌活性与指标性成分的相关性。表 5 中结果所示，地榆 6、8 min 炮制品对金黄色葡萄球菌的抑菌效果最好，优于生地榆，而炭化过度的 10、14 min 炮制品则不达；这个结果与“2.4”项下实验结果相对应，即炮制程度适中能够增加效应物质含量，也能增强药效，炮制过度则不达。现有研究中多篇文献报道了地榆止血作用随着炮制程度的增加呈现先增强后下降的趋势，炮制时间过长止血作用便不再明显^[5,34]，这种现象或许与地榆的过度炭化相关。

表 5 地榆及不同炮制程度地榆炮制品（250 $^{\circ}$ C）对金黄色葡萄球菌的 MIC ($n=3$)

Table 5 MIC of SR and CSR with different processing degree ($n=3$)

样品	MIC/(μ g $\cdot$ mL $^{-1}$)		
生地榆	128	128	128
250 $^{\circ}$ C 6 min 炮制品	64	64	64
250 $^{\circ}$ C 8 min 炮制品	64	64	128
250 $^{\circ}$ C 10 min 炮制品	128	128	128
250 $^{\circ}$ C 14 min 炮制品	128	128	128
阳性药	2	2	2

将表 5 中地榆及其不同程度炮制品抑菌 MIC 值与表 3 中地榆炭提取物指标性成分含量做 Pearson 相关性分析，结果表明，没食子酸、鞣花酸含量与 MIC 值的 Pearson 相关系数分别为-0.817 1、0.538 2，表明地榆炭对金黄色葡萄球菌的抑菌效果与没食子酸的含量相关性较大，且呈正相关性（因 MIC 值越大表明抑菌效果越弱，Pearson 相关系数为负数却表明两者之间的正相关性），即炮制过程中观测没食子酸含量能够一定程度上反应地榆炭的抑菌功效。同时，近期基于灰色关联分析研究地榆炒炭止血的物质基础，结果表明没食子酸是地榆炭中发挥凝血止

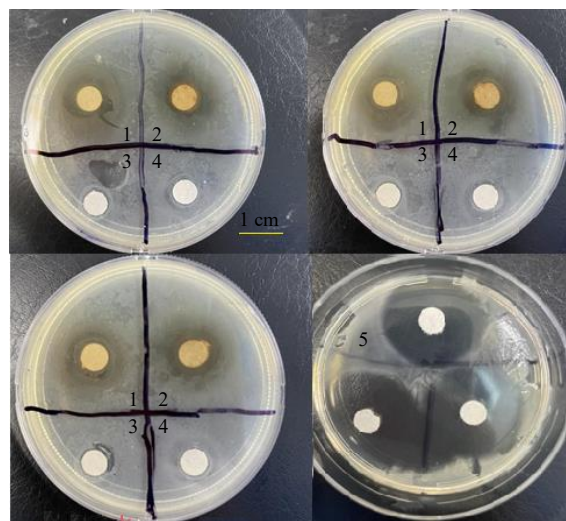
血活性的重要成分^[35]，所以提出可以将没食子酸含量视为地榆炒炭 Q-Marker 的研究思路。

综上，地榆采用自动炒货机在 250 $^{\circ}$ C 温度条件下炒炭 6 min 能获得具最优抑菌效果的地榆炭，且此时地榆炭提取物得率达 30% 左右，指标性成分没食子酸在提取物 [(46.41 $\pm$ 0.06) mg/g] 和饮片中 [(14.20 $\pm$ 0.02) mg/g]，含量均达峰值。

2.8 抑菌圈实验验证最优炮制工艺下地榆炭的抑菌效果

根据“2.7”项下优化所得最优炮制工艺制备地榆炭，参照《中国药典》2020 年版通则 2202 项下鞣质含量测定法测定总鞣质含量，地榆、地榆炭中总鞣质含量分别为 (18.65 $\pm$ 0.06) %、(9.86 $\pm$ 0.08) %，均符合药典标准。

因中药抑菌效应远弱于抗生素，不能形成轮廓清晰、圆整澄清的抑菌圈，也受中药药液颜色的影响，所以仅用抑菌圈直径的大小来评价中药抑菌效应不太客观。图 3 所示实验结果表明，同质量浓度下，地榆炭组能形成边界较清晰的抑菌内圈，其直径为 (1.33 $\pm$ 0.12) cm（以细菌几无生长、澄明度显澄清的内圈直径计），以及抑菌外圈（无明显边界，浑浊），而地榆组因在培养皿表面抑菌深度浅，只有抑菌外圈，未观察到边界清晰、几无细菌生长的抑菌内圈，表明抑菌圈实验与微量液基稀释法（表 5）实验结果相似，地榆、地榆炭均显示一定抑菌效果，且最优炮制工艺下的地榆炭优于生地榆，表明炮制



1-地榆提取物 2-地榆炭提取物 3-生理盐水 4-溶剂 5-阳性药
1-extract of SR 2-extract of CSR 3-normal saline 4-solvent 5-positive drug

图 3 抑菌圈实验 ($n=3$)

Fig. 3 Inhibition zone experiment ($n=3$)

工艺对中药效应的重要影响。

4 讨论

“凡药制造,不及则功效难求,太过则气味反失”(《本草蒙筌》)道出了炮制的上下限度要求。本研究从药效与灰化 2 个角度阐释了“炒炭存性”的科学内涵,通过实验结果对前言提出的问题进行解答:地榆炭存地榆之性,也具显著抗菌效果,且在优化的炮制工艺下抗菌功效显著强于生地榆;筛选得最优炒炭工艺条件为 250 ℃温度条件下炒炭 6 min;此时地榆炭提取物得率达 30%左右,没食子酸含量达峰值,具显著优于生地榆的抑菌效果;提出可以将没食子酸含量视为地榆炒炭 Q-Marker 的研究思路;提出地榆炭提取物得率的突然下降可视为饮片过度炭化的关键节点,即灰化临界点的研究思路。

课题组前期对地榆炒炭前后的成分进行了定性和定量的研究,表明地榆炒炭过程中发生了大量大分子裂解成小分子的事件,其中没食子酸和鞣花酸分别为没食子酸鞣质与鞣花酸鞣质高温裂解的终端产物,其中没食子酸能够进一步转化为其下游产物焦性没食子酸(另撰文发表)。本实验结果印证了上述结果,即随着地榆高温炮制,没食子酸含量先增加后减少,鞣花酸含量则一直上升^[5]。炭药的品质与其炒炭工艺息息相关,研究结果解释了经常出现同一种炭药的临床疗效或研究结果有差异甚至截然不同的现象,由此凸显根据药效优化和规范炒炭工艺的重要性。

有研究结果表明,市售地榆炭色泽普遍较深,外表为棕黑或黑色,内部多为棕黑色或黑褐色,粉末多为棕黑或黑褐色,醇浸出物得率显著低于生品,83%市售地榆炭中鞣质含量未达生品中 1/3^[36],由于地榆炭中鞣质含量随炮制程度增加而下降^[5],以上现象均预示市售地榆炭可能普遍存在过度炭化现象。同时,课题组前期也对不同出处地榆炭进行品质考察,饮片色泽普遍较深,没食子酸 2.15~12.28 mg/g,鞣花酸 5.33~12.76 mg/g,多为没食子酸含量低于鞣花酸,同样揭示了市售地榆炭普遍存在过度炭化现象。从没食子酸含量来看市售地榆炭品质远低于本研究中优化炮制工艺所得地榆炭(14.20±0.02) mg/g;然而,优化工艺所得地榆炭表面焦褐色,内部焦浅褐色,与药典所述“表面焦黑色、内部焦褐色”不甚相符;而当将地榆炮制至药典所述外观性状时(8 min, 290 ℃或 10 min, 250 ℃),其已开始越过灰化临界点。有趣的是,药典对没食

子酸含量的规定,地榆炭(不少于 0.60%)比地榆(不少于 1.0%)中低,与其对饮片色泽描述(“表面焦黑色、内部焦褐色”)相一致。

地榆炭的研究尚处起步阶段,只有建立和完善质量标准,规范炮制工艺,量化检测手段,才能保证饮片质量的稳定性,有利于进一步临床应用与基础研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 130-131.
- [2] 俞浩, 毛斌斌, 刘汉珍. 炒炭对地榆中鞣质量及止血效果的影响 [J]. 中成药, 2014, 36(6): 1317-1320.
- [3] 郭淑艳, 贾玉良, 徐美术. 地榆炒炭前后止血作用的研究 [J]. 中医药学报, 2001, 29(4): 28.
- [4] 顾国栋. 正交设计法优选地榆炭的炮制工艺 [J]. 江苏中医药, 2009, 41(12): 69.
- [5] 赵慧, 张学顺, 戴衍朋, 等. 炮制对地榆中鞣质类成分含量及凝血作用的影响 [J]. 山东农业科学, 2018, 50(12): 127-131.
- [6] 王议忆, 周展来, 李卫先. 地榆、蒲黄炒炭炮制前后显微特征比较 [J]. 中医药导报, 2008, 14(12): 75-76.
- [7] 龚跃新, 陆小龙. 20 味中药炒炭前后的溶出液中微量元素的研究 [J]. 中国中药杂志, 1991, 16(2): 85-87.
- [8] 张向阳, 赵如同, 刘春燕, 等. 地榆、地榆炭对小鼠止血作用影响的实验研究 [J]. 河北中医, 2017, 39(5): 735-738.
- [9] Yang JH, Yoo JM, Cho WK, et al. Anti-inflammatory effects of *Sanguisorbae Radix* water extract on the suppression of mast cell degranulation and STAT-1/Jak-2 activation in BMMCs and HaCaT keratinocytes [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2016, 16: 347.
- [10] Su X D, Guo R H, Yang S Y, et al. Anti-bacterial effects of components from *Sanguisorba officinalis* L. on *Vibrio vulnificus* and their soluble epoxide hydrolase inhibitory activity [J]. *Nat Prod Res*, 2019, 33(23): 3445-3449.
- [11] 王航, 孟春, 石贤爱, 等. 抗菌中草药的筛选及其有效成分的分离提取和初步鉴定 [J]. 中国药业, 2006, 15(20): 15-16.
- [12] Liu Y, Nielsen M, Staerk D, et al. High-resolution bacterial growth inhibition profiling combined with HPLC-HRMS-SPE-NMR for identification of antibacterial constituents in Chinese plants used to treat snakebites [J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 155(2): 1276-1283.
- [13] Kokoska L, Polesny Z, Rada V, et al. Screening of some Siberian medicinal plants for antimicrobial activity [J]. *J Ethnopharmacol*, 2002, 82(1): 51-53.

- [14] 张斌, 鲁兰, 王英英, 等. 地榆水提液对临床耐药菌 MRSA 的抗菌活性及机理研究 [J]. 中药药理与临床, 2020, 36(4): 120-124.
- [15] 耿玲, 陈俊雅, 李洪文, 等. 紫地榆提取物体外抗菌活性研究 [J]. 大理学院学报, 2014, 13(10): 14-17.
- [16] Chen X, Shang F, Meng Y, et al. Ethanol extract of *Sanguisorba officinalis* L. inhibits biofilm formation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in an Ica-dependent manner [J]. *J Dairy Sci*, 2015, 98(12): 8486-8491.
- [17] 摆倩文, 张邵博, 陈士恩, 等. 三种中草药提取物对大肠杆菌的抑制作用 [J]. 西北民族大学学报: 自然科学版, 2020, 41(3): 73-78.
- [18] 顾薇, 陈军, 苏曼, 等. 地榆炭在体股癣、手足癣防治中的应用: 中国, 202010570186. X [P]. 2020-08-11.
- [19] 陈霞, 张其中, 李春涛. 50 种中草药体外抑杀嗜水气单胞菌的药效研究 [J]. 中国预防兽医学报, 2011, 33(11): 862-865.
- [20] 彭丹, 马琼丽, 陈泽慧, 等. 40 种中药提取物对 6 种临床常见感染菌株的体外抑菌活性观察 [J]. 山东医药, 2017, 57(27): 27-30.
- [21] 卫文强, 吴润, 刘磊. 四味中草药体外抗菌作用研究 [J]. 安徽农业科学, 2009, 37(6): 2530-2531.
- [22] 贺涛涛. 地榆提取物制备工艺及抑菌作用研究 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2020.
- [23] 刘佳龙, 杜西翠, 杨柳, 等. 中药地榆对奶牛乳房炎常见病原菌抑菌试验观察 [A] // 中国畜牧兽医学会中兽医学分会 2013 年学术年会论文集 [C]. 哈尔滨: 中国畜牧兽医学会中兽医学分会, 2013: 494-498.
- [24] 陈惠, 赵鑫荟, 艾启俊. 3 种中草药对沙门氏菌的抑制机理初探 [J]. 安徽农业科学, 2013, 41(25): 10275-10277.
- [25] Kim S, Oh S, Noh H B, et al. *In vitro* antioxidant and anti-*Propionibacterium acnes* activities of cold water, hot water, and methanol extracts, and their respective ethyl acetate fractions, from *Sanguisorba officinalis* L. roots [J]. *Molecules*, 2018, 23(11): 3001.
- [26] Shen X, Zhang W, Peng C, et al. *In vitro* anti-bacterial activity and network pharmacology analysis of *Sanguisorba officinalis* L. against *Helicobacter pylori* infection [J]. *Chin Med*, 2021, 16(1): 33.
- [27] 张蕾, 满莉, 宛春雷, 等. 地榆提取物的体外抑菌活性及机制 [J]. 吉林大学学报: 理学版, 2019, 57(3): 701-707.
- [28] 王丽, 王强, 裴洪利, 等. 13 种中草药对申克孢子丝菌抑菌实验研究 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2018, 20(4): 23-25.
- [29] 李汉成, 贾桂燕. 15 种常见中草药抗菌活性筛选 [J]. 今日药学, 2016, 26(11): 792-795.
- [30] Wang S, Luo J, Liu X Q, et al. Antibacterial activity and synergy of antibiotics with sanguisorbigenin isolated from *Sanguisorba officinalis* L. against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. *Lett Appl Microbiol*, 2021, 72(3): 238-244.
- [31] 张向阳, 魏红, 郑海萍, 等. 地榆炭的研究进展 [J]. 环球中医药, 2014, 7(2): 158-160.
- [32] Ding A, Xiang Y, Li J, et al. Research on the technology of processing carbonized root of *Sanguisorba officinalis* L. and the quality standards for its prepared pieres [J]. *Chin J Chin Mater Med*, 1995(12): 725-728.
- [33] 顾薇, 陈军, 姚俊宏, 等. 地榆炭提取物在外用止痒剂中的应用: 中国, 202110664985.8 [P]. 2021-06-16.
- [34] 蔡靓. 中药地榆炮制前后药效变化及相关活性成分研究 [D]. 重庆: 重庆大学, 2019.
- [35] 赵慧. 基于灰色关联分析的地榆炭止血物质基础初步研究 [D]. 济南: 山东中医药大学, 2019.
- [36] 钟方晓, 董学, 王萌, 等. 不同地区地榆炭外观及内在质量分析 [J]. 中医药导报, 2009, 15(3): 87-88.

[责任编辑 郑礼胜]