

不同提取工艺对肺毒清抗炎、镇痛及解热作用的影响

徐玉玲¹, 潘春晖², 张煊^{1,2}, 伍利华¹, 李鹏程¹, 王鸿¹, 冯晶晶¹, 刘涛^{1*}
(1. 成都大学 药学与生物工程学院, 成都 610106;
2. 四川德成动物保健品有限公司, 四川 德阳 618000)

[摘要] 目的:比较不同提取工艺(全方水提,栀子水提醇沉与苦参、木蝴蝶醇提,全方醇提,分别记为工艺 1,2,3)对肺毒清抗炎、镇痛、解热作用的影响。方法:通过二甲苯致小鼠炎症实验比较不同提取工艺肺毒清的抗炎作用,通过冰乙酸扭体实验比较不同提取工艺肺毒清的镇痛作用,通过 2,4-二硝基酚致大鼠发热比较不同提取工艺肺毒清的解热作用。结果:工艺 1 样品能显著抑制二甲苯致小鼠发炎($P<0.05$),工艺 2 样品能极显著抑制小鼠发炎($P<0.01$);工艺 1 样品能显著抑制冰乙酸致小鼠扭体次数($P<0.05$),工艺 2 和 3 样品能极显著抑制小鼠扭体次数($P<0.01$),且工艺 2 样品的抑制率高于工艺 3;工艺 2 样品能显著抑制 2,4-二硝基酚致大鼠发热。结论:提取工艺对肺毒清的药效有较大影响,工艺 2 样品的抗炎、镇痛、解热作用更好。

[关键词] 肺毒清; 抗炎; 镇痛; 解热; 木蝴蝶
[中图分类号] R283.6;R945;S481+.9 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2016)14-0023-04
[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016140023
[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160523.1017.006.html>
[网络出版时间] 2016-05-23 10:17

Effect of Different Extraction Technology on Anti-inflammatory, Analgesic and Antipyretic Action of Feiduqing

XU Yu-ling¹, PAN Chun-hui², ZHANG Xuan^{1,2}, WU Li-hua¹,
LI Peng-cheng¹, WANG Hong¹, FENG Jing-jing¹, LIU Tao¹
(1. School of Pharmacy and Bioengineering, Chengdu University, Chengdu 610106, China;
2. Sichuan Decheng Animal Health Products Co. Ltd., Deyang 618000, China)

[Abstract] Objective: To compare effect of different extraction technology (water extraction of whole prescription, water extract-alcohol precipitation of Gardeniae Fructus and alcohol extraction of Oroxyli Semen and Sophorae Flavescentis Radix, alcohol extraction of whole prescription, they were referred to as process 1, 2 and 3) on anti-inflammatory, analgesic and antipyretic action of Feiduqing. Method: Anti-inflammatory effect of Feiduqing with different extraction technology was compared by inflammation test induced by xylene in mice; through glacial acetic acid writhing test to compare analgesic effect of Feiduqing with different extraction technology; by 2, 4-dinitrophenol induced rat fever to compare antipyretic effect of Feiduqing with different extraction technology. Result: Sample of process 1 could significantly inhibit inflammation induced by xylene in mice and sample of process 2 could significantly inhibit inflammation induced by xylene in mice. Sample of process

[收稿日期] 20150914(007)
[基金项目] 四川省卫生计生厅科研课题(130405);四川省千人计划项目(2013332);成都市科技局高校院所应用成果转化项目(12DXYB020JH-002)
[第一作者] 徐玉玲,硕士,高级工程师,从事中药制剂的研究开发及中成药质量再评价工作,Tel:028-84616590,E-mail:xuyuling@edu.cn
[通讯作者] * 刘涛,博士,研究员级高级工程师,从事中药新药研究及成药质量再评价研究工作,E-mail:liutao0578@sina.com

1 could significantly inhibit times of writhing caused by acetic acid; samples of process 2 and 3 could significantly inhibit times of writhing caused by acetic acid; inhibition rate of sample of process 2 was higher than sample of process 3. Sample of process 2 could significantly inhibit fever induced by 2, 4-dinitrophenol. **Conclusion:** Extraction process has great impact on efficacy of Feiduqing; anti-inflammatory, analgesic and antipyretic effect of sample of process 2 is the best.

[**Key words**] Feiduqing; anti-inflammation; analgesic; antipyretic; Oroxyli Semen

肺毒清是治疗病毒性肺炎的临床经验方,目前正在进行中药六类新药的研制工作。该方由木蝴蝶、栀子及苦参组成,方中木蝴蝶为君药,栀子为臣药,苦参为佐使药,具有清热解毒、止咳化痰的功效^[1-2]。中药的提取工艺是指采用适当的溶剂和方法使中药所含有效成分或有效部位浸出的操作,应最大程度地保留有效成分和辅助成分,同时尽量减少无效成分,即是一个去粗取精的过程。目前多用药材中指标性成分作为提取工艺合理性筛选的依据,但药物是用于临床治疗疾病的物质,单纯以化学成分为指标对药物的提取工艺路线进行筛选与药物属性不完全相符。本课题组已有研究表明,不同的提取路线对肺毒清的体外抗病毒效果有一定影响^[3]。本研究拟对不同提取工艺制备的肺毒清在解热、抗炎及镇痛方面的作用进行研究,以筛选出药效作用较优的制备工艺,为保证该方的临床有效性提供实验依据。

1 材料

BSA224S-CW 型电子分析天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司],BT-A11 型电子体温计(东莞市福达康实业有限公司)。醋酸地塞米松片(浙江仙琚制药股份有限公司,批号 140517),阿司匹林泡腾片(AstraZeneca 公司,批号 1408090),二甲苯、冰乙酸(成都市科龙化工试剂厂),2,4-二硝基酚(山东西亚化学工业有限公司),纯净水(华润怡宝食品饮料有限公司),肺毒清(自制,采用工艺 1,2,3 制备,批号分别为 20141204,20141212,20141213)。

清洁级昆明种小鼠,体重 18~22 g;SD 大鼠,体重 180~200 g,雌雄各半。均由成都达硕实验动物有限公司提供,合格证号 SCXK(川)2013-24。

2 方法与结果

2.1 肺毒清不同提取工艺样品的制备

2.1.1 工艺 1 按处方比例称取栀子、苦参、木蝴蝶,加 10 倍量水回流提取 3 次,提取时间依次为 1.0,0.5,0.5 h,合并提取液,浓缩至相对密度 1.20(70℃),干燥,即得。

2.1.2 工艺 2 按处方比例称取栀子适量,加 12

倍量水回流提取 3 次,提取时间依次为 1.0,0.5,0.5 h,合并提取液,浓缩至相对密度 1.20(70℃);加 95%乙醇至乙醇体积分数达 85%,取上清液浓缩至相对密度 1.20(70℃),干燥,得中间体 1。按处方比例称取苦参、木蝴蝶适量,加 12 倍量 75%乙醇回流提取 3 次,每次 1.0 h,合并提取液,浓缩至相对密度 1.20(70℃),干燥,得中间体 2。将中间体 1 与 2 混合均匀,即得。

2.1.3 工艺 3 按处方比例称取栀子、苦参、木蝴蝶适量,加 10 倍量 75%乙醇回流提取 3 次,每次 1.0 h,合并提取液,浓缩至相对密度 1.20(70℃),干燥,即得。3 个工艺干膏中指标成分的测定参考《中国药典》2015 年版相关项下方法,见表 1。

表 1 不同提取工艺肺毒清干膏中指标性成分的含量测定
Table 1 Determination of index component in Feiduqing dry extract with different extraction technology

工艺	出膏率 /%	生药量 /g·g ⁻¹	栀子苷 /mg·g ⁻¹	黄芩苷 /mg·g ⁻¹
1	24.67	4.05	38.83	2.41
2	15.80	6.33	81.66	11.49
3	18.94	5.28	80.55	9.92

2.2 抗炎试验^[4] 取 50 只雄性小鼠,体重 18~22 g,随机分为 5 组,每组 10 只,按表 2 设计的剂量连续灌胃给药 7 d,于末次给药后 1 h,将二甲苯 0.05 mL 涂于小鼠右耳(正反面各 25 μL),左耳不涂作为对照,于致炎后 1 h 脱颈椎法处死,沿耳廓线剪下两耳,用直径 8 mm 的打孔器于两耳同一部位打下耳片,立即用电子天平称重,以两耳片质量之差作为肿胀度,按(空白组肿胀度-用药组肿胀度)/空白组肿胀度×100%计算耳肿胀抑制率,见表 2。结果表明工艺 1,2 样品均能明显抑制二甲苯致小鼠耳郭的肿胀,且工艺 2 优于工艺 1。

2.3 镇痛试验^[5-6] 取 50 只小鼠,雌雄各半,体重 18~22 g,随机分为 5 组,每组 10 只,按表 3 所示剂量灌胃给药,于给药后 1 h,按 0.2 mL/只注射 0.7%冰乙酸,记录注射冰乙酸后 15 min 内各小鼠出现扭

表 2 肺毒清对二甲苯致小鼠耳廓肿胀的影响($n=10$)

Table 2 Effect of Feiduqing on mice auricle swelling induced by xylene($n=10$)

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	肿胀度/ mg	肿胀抑制率/%
空白	—	6.80 ± 1.30	—
地塞米松	2.57×10^{-4}	$4.95\pm2.17^{1)}$	27.21
肺毒清 工艺 1	0.76	$4.62\pm2.44^{1)}$	32.06
工艺 2	0.49	$4.40\pm1.36^{2)}$	35.29
工艺 3	0.58	5.88 ± 1.27	13.53

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$ (表 2,3 同)。

体的次数,按(空白组扭体次数-用药扭体次数)/空白组扭体次数 $\times100\%$ 计算抑制率,见表 3。结果表明不同提取工艺制备的肺毒清都能减少小鼠扭体次数的反应,与空白组比较具有显著性差异($P<0.05$, $P<0.01$),且工艺 2,3 样品的抑制率与阳性组接近,工艺 2 样品的抑制率大于工艺 3 样品。

2.4 解热试验^[7] 取 SD 级大鼠,体重 180~200 g,于温度 21~23℃,相对湿度 60%的动物房中

表 4 肺毒清对 2,4-二硝基酚致大鼠发热的影响($n=10$)

Table 4 Effect of Feiduqing on rat fever induced by 2,4-dinitrophenol($n=10$)

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	基础体温/ $^{\circ}\text{C}$	不同时间点温度升高值/ $^{\circ}\text{C}$		
			1 h	2 h	3 h
空白	—	37.77 ± 0.30	2.25 ± 0.76	1.96 ± 0.30	1.73 ± 0.42
阿司匹林	0.20	37.96 ± 0.53	$1.41\pm0.75^{1)}$	$1.13\pm0.25^{1)}$	$0.93\pm0.13^{1)}$
肺毒清 工艺 1	1.52	37.96 ± 0.36	1.70 ± 0.59	1.49 ± 0.64	1.43 ± 0.50
工艺 2	0.97	38.00 ± 0.36	$1.48\pm0.45^{1)}$	$1.29\pm0.53^{2)}$	$1.05\pm0.42^{2)}$
工艺 3	1.17	38.01 ± 0.46	1.79 ± 0.83	1.62 ± 0.45	1.31 ± 0.50

2.5 抗炎、镇痛、解热作用与指标成分含量的探讨 指标性成分给药量是指每千克(体重)所给剂量(干膏)中肺毒清指标性成分(栀子苷与黄芩苷)的质量,见表 5。肺毒清的抗炎、镇痛、解热作用与指标成份含量的关系分别见图 1~3。结果显示肺毒清的抗炎、镇痛、解热效果与指标性成分栀子苷或黄芩苷含量并不成正相关。

3 讨论

本文解热试验中发现阿司匹林组的大鼠出现反应迟钝、僵直、死亡现象,2 h 内死亡 5 只,2 h 后的大鼠都活了下来。原因可能如文献[8]研究所述,2,4-二硝基酚与乙酰水杨酸合用,增加了乙酰水杨酸的毒性。中药组成成分复杂,起药效的不一定是指标性成分。肺毒清由木蝴蝶、栀子及苦参组成,根据文献资料中条件测定了君药及臣药中指标性成分

表 3 肺毒清对冰乙酸致小鼠扭体的影响($n=10$)

Table 3 Effect of Feiduqing on mice writhing induced by glacial acetic acid($n=10$)

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	扭体数/次	抑制率/%
空白	—	37.3 ± 11.07	—
阿司匹林	0.20	$11.1\pm3.11^{2)}$	70.24
肺毒清 工艺 1	1.52	$13.2\pm6.20^{1)}$	64.61
工艺 2	0.97	$10.2\pm4.34^{2)}$	72.65
工艺 3	1.17	$11.8\pm4.73^{2)}$	68.36

适应喂养 3 d,再连续 3 d 测定肛温,早晚各 1 次,选取体温变化不超过 0.3℃的 50 只,雌雄各半,随机分为 5 组,每组 10 只,实验前禁食不禁水 16 h。按表 4 所示剂量灌胃给药,空白组给予等体积水,连续给药 3 d。末次给药后 1 h,按 $20\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 背部皮下注射 2,4-二硝基酚致热,于注射后 1,2,3 h 各测肛温 1 次,见表 4。结果与空白组比较,工艺 2 组具有统计学差异($P<0.05$, $P<0.01$),其解热时间可持续到 3 h,工艺 1 组与工艺 3 组则无统计学差异。

表 5 不同提取工艺的肺毒清指标性成分给药量

Table 5 Dosage of index components in Feiduqing with different extraction technology

组别	抗炎作用		解热与镇痛作用	
	栀子苷	黄芩苷	栀子苷	黄芩苷
工艺 1	29.51	1.83	59.02	3.66
工艺 2	40.01	5.63	79.21	11.15
工艺 3	46.72	5.75	94.24	11.61

注:指标性成分给药量=剂量 $\times$ 干膏中指标性成分含量。

含量^[9-11]。实验结果表明工艺 2 制备的肺毒清对小(大)鼠给药量中栀子苷和黄芩苷的含量、给药量均不是最高的,但其抗炎、镇痛、解热作用均为最好。提示药效与指标性成分含量并不一定成正相关。中药的药效是各种成分的协同或拮抗作用的总和,单

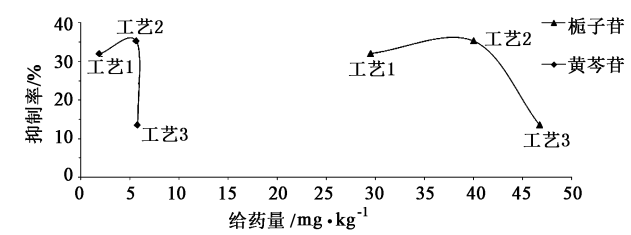


图 1 肺毒清抗炎量效关系
Fig. 1 Dose-effect relationship of anti-inflammatory of Feiduqing

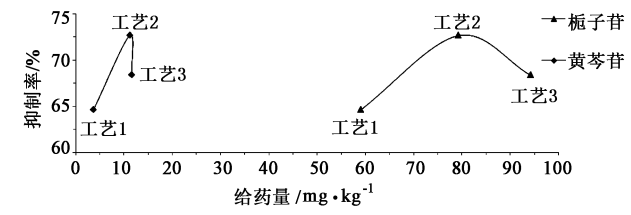


图 2 肺毒清镇痛量效关系
Fig. 2 Dose-effect relationship of analgesic of Feiduqing

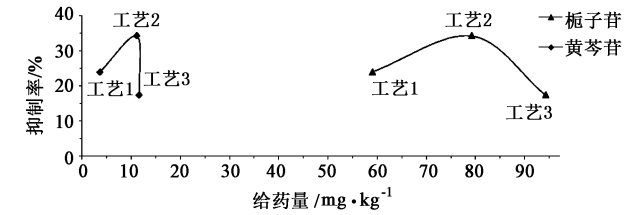


图 3 肺毒清解热量效关系
Fig. 3 Dose-effect relationship of antipyretic of Feiduqing

一成分代表不了整个中药(中药材、饮片、中成药)的品质^[12]。说明用指标成分含量评价中药提取工艺的优劣,其合理性有待进一步研究确认。由于在实验中,苦参中成分测定有干扰,鉴于其是佐使药,未对其所含成分进行测定。在本研究过程中,参照了相关文献用黄芩苷作为木蝴蝶的指标性成分,《中国药典》2015 年版在木蝴蝶项下将木蝴蝶苷 B 作为其含量控制指标,两者的相关性有待进一步研究。

本文研究结果表明工艺 1,2 样品的抗炎和解热作用优于工艺 3,而工艺 2,3 样品的镇痛作用优于工艺 1。推测,肺毒清的抗炎与解热活性成分主要在槲子中,且水溶性较醇溶性好;肺毒清镇痛活性成分的醇溶性较水溶性好。工艺路线对提取出来的化学物质有一定的影响,本研究所选择的工艺路线是

根据临床常用提取方法(以水为溶媒进行提取,工艺 1),制药工业生产常用方法水提醇沉法(工艺 2),醇提法(工艺 3)及参考文献[1-3]进行设计的,各有优劣,工艺 1 与临床经验方的临床使用实际相符,但未考虑药材中化学成分的性质,工艺 3 与中成药大生产相适应,但生产成本低,工艺 2 则同时兼顾了临床经验方及中成药大生产的实际情况。

[参考文献]

[1] 刘涛,李娟,徐玉玲,等. 苦参提取工艺优选[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(20):58-60.

[2] 刘涛,郭晓恒,吴春梅,等. 肺毒清颗粒中有效成分的含量测定及转移率考察[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(10):54-56.

[3] 刘涛,李娟,吴春梅,等. 不同提取工艺对肺毒清体外抗病毒作用的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(18):42-44.

[4] 李光民,储金秀,韩淑英. 三七乳香合剂镇痛抗炎作用的实验研究[J]. 河北医药,2015,37(10):1458-1460.

[5] 许阳光,曹晨,尚明英,等. 不同产地北细辛和华细辛镇痛抗产药效学评价[J]. 中国中药杂志,2013,37(5):625-631.

[6] 徐叔云,卞如谦,陈修. 药理实验方法学[M]. 北京:人民卫生出版社,2002:770-773.

[7] 雷玲,王强,白筱璐,等. 安息香的抗炎解热作用研究[J]. 中药药理与临床,2012,28(2):109-110.

[8] 张富庚,胡人杰,姜卉. 2,4-二硝基酚对乙酰水杨酸急性毒性的影响[J]. 天津医科大学学报,2002,8(2):189-190.

[9] 易莉,易玲,汪良. 木蝴蝶的质量标准研究[J]. 湖北中医药大学学报,2014,16(3):57-59.

[10] 王锐,熊汝琴,罗家刚,等. 木蝴蝶提取物对酪氨酸酶的抑制及抗氧化作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(18):70-72.

[11] 李慧,魏梅,陈向东. HPLC 法同时测定木蝴蝶配方颗粒中木蝴蝶苷 B 和黄芩苷的含量[J]. 广东药学院学报,2014,30(6):714-716.

[12] 万德光. 论中药品质理论的继承与创新[J]. 中药与临床,2010,1(1):3-6.

[责任编辑 刘德文]