

• 实验与方药 •

消肿止痛颗粒提取工艺抗炎镇痛药效筛选研究

杜茂波¹ 刘淑芝¹ 姜华² 李晓东² 沈硕¹ 姚瑶¹ 何爱萍¹¹中国中医科学院中药研究所中药制剂研究中心, 北京 100700; ²甘肃省中医药研究院中药研究所, 兰州 730050

通信作者: 刘淑芝, Email: liushuzhi2004@sina.com, 电话: 010-84043227

【摘要】 目的 筛选消肿止痛颗粒的提取工艺。**方法** 设计工艺 1 中的三七与其他药一起醇提, 工艺 2 中的三七粉碎后直接入药, 制备工艺 1、工艺 2 样品溶液。将大鼠或小鼠按随机数字表法分为空白组、工艺 1 组、工艺 2 组和合剂组。工艺 1 组灌胃 2.07 g/ml 浓度的工艺 1 样品溶液, 工艺 2 组灌胃 1.06 g/ml 浓度的工艺 2 样品溶液, 合剂组灌胃 0.015 ml/g 消肿止痛合剂, 空白组灌胃等体积生理盐水。以醋酸扭体、热板、耳廓肿胀、蛋清致足跖肿胀实验评价其抗炎镇痛作用。**结果** 与空白组比较, 工艺 1 组、工艺 2 组小鼠平均扭体数[(35.50±8.06)%、(35.00±7.63)%比(47.00±1.45)%]减少($P<0.01$); 耳廓肿胀度[(46.31±22.25)%、(45.41±21.43)%比(73.89±15.55)%]降低; 与空白组比较, 给药后 1、2、3、4 h, 工艺 1 组、工艺 2 组小鼠痛阈提高百分率升高($P<0.01$); 致炎后 0.5、1、2、4 h, 各组大鼠足跖肿胀抑制率比较, 差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 消肿止痛颗粒的提取工艺路线设计合理, 三七全部入药消肿止痛效果更佳。

【关键词】 中药工艺改进; 消肿止痛颗粒; 提取法; 镇痛; 大鼠; 小鼠**基金项目:** 中国中医科学院自主选题项目(2011xyc-06)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4246.2019.02.014

Study on anti-inflammatory and analgesic effect of Xiaozhong-Zhitong granule extraction technology

Du Maobo¹, Liu Shuzhi¹, Jiang Hua², Li Xiaodong², Shen Shuo¹, Yao Yao¹, He Aiping¹¹Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;²Gansu Provincial Academy of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730050, China

Corresponding author: Liu Shuzhi, Email: liushuzhi2004@sina.com, Tel: 010-84043227

【Abstract】 Objective In this paper, the extraction process of Xiaozhong-Zhitong granule (XZG) was investigated. **Methods** In Process 1, the *Panax notoginseng* (Burk.) F.H.Chen was extracted with other drugs, and in the process 2, the *Panax notoginseng* (Burk.) F.H.Chen was crushed and directly used as medicine. Rats were randomly divided into blank group, process 1 group, process 2 group and mixture group. The sample concentration of the process 1 group 1 for the stomach was 2.07 g/ml, and the sample concentration of the process 2 group 1 for the stomach was 1.06 g/ml, and the sample concentration of the mixture group for the stomach was 0.015 g/ml, and blank group gavaged equal volume saline. Anti-inflammatory and analgesic effects of acetic acid writhing test, hot plate test, auricle swelling test and egg white-induced plantar swelling test were evaluated. **Results** Compared with the blank group after 1, 2, 3, and 4 h after administration, the average writhing number of the mice in the process group 1 and the process 2 group ($35.50\% \pm 8.06\%$, $35.00\% \pm 7.63\%$ vs. $47.00\% \pm 1.45\%$) significantly decreased ($P<0.01$), and the auricular swelling degree ($46.31\% \pm 22.25\%$, $45.41\% \pm 21.43\%$ vs. $73.89\% \pm 15.55\%$) significantly decreased. And compared with the blank group after 0.5, 1, 2, and 4 h after inflammation, the percentage of pain threshold in the first group and the second group increased ($P<0.01$). While there was no significant difference in the inhibition rate of paw swelling in each

group ($P>0.05$). **Conclusions** The design of extraction process of XZG was reasonable; when treating swelling and pain, it was better to put the powder of *Panax notoginseng* (Burk.) F.H.Chen in XZG.

【Key words】 Technology improving (TCD); *Xiaozhong-Zhitong* granule; Extraction; Analgesia; Rats; Mice

Fund program: China Academy of Chinese Medical Sciences Self-selected Project (2011xyc-06)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4246.2019.02.014

消肿止痛合剂(甘药制字 Z04000844)为甘肃省中医院的院内制剂,由桃仁、生地黄、泽兰、红花、当归、水蛭、赤芍、木香、甘草、川芎、青皮、三七等12味中药组成,具有活血消肿、行气止痛的功效,用于跌打损伤早期伤部肿胀、疼痛等症。

颗粒剂既保持了原合剂的特点和处方要求,又便于服用,且颗粒溶解快、吸收好,有利于药效的发挥,是中药常用剂型。本研究根据处方特点和临床需要,拟将其改成颗粒剂。处方中三七皂苷类成分用醇提较为合适^[1],而在临床上三七常粉碎后直接入药,因此设计2条提取工艺路线,工艺1中的三七与其他药一起醇提,工艺2中的三七粉碎后直接入药。以醋酸扭体实验^[2-4]、热板实验^[3-6]、耳廓肿胀实验^[7-9]、蛋清致足跖肿胀^[10-12]评价其镇痛抗炎作用,并与原工艺进行比较,筛选消肿止痛颗粒的提取工艺路线。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF级昆明种小鼠,雌雄兼有,体重20~22 g; Wistar大鼠,雌雄各半,180~220 g,由中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心提供,合格证号SCXK-(军)-2009-0017。所有实验动物于塑料鼠笼中适应性饲养7 d,温度23~25℃,湿度50%~60%,正常光照,喂食普通鼠饲料和蒸馏水。

1.2 药品与试剂

桃仁、生地黄、泽兰、红花、当归、水蛭、赤芍、木香、甘草、川芎、青皮、三七等均购自北京仟草中药饮片有限公司,经中国中医科学院中药研究所杜茂波助理研究员鉴定符合2015年版

《中华人民共和国药典》规定。冰醋酸(北京化学试剂公司,批号030506);二甲苯(上海化学试剂公司,批号20150230);0.9%氯化钠溶液(山东齐鲁药业有限公司,批号3B16012901)。消肿止痛合剂由甘肃省中医院制剂中心提供。

1.3 实验仪器

BSA224S CW型电子分析天平、CPA225D电子天平(德国赛多利斯公司);YLS-6A智能热板仪(上海特惠公司);YLS-7B足趾容积测量仪(江苏赛昂斯生物科技有限公司);YLS-Q4耳肿打耳器(山东省医学科学院设备站)。

1.4 消肿止痛颗粒提取工艺

1.4.1 水提步骤:参考文献[13]方法,取处方量桃仁、红花、泽兰、水蛭、甘草,用8倍水,提取3次,1 h/次,合并水提液,水浴浓缩至药液:药材=1:1时,进行醇沉,醇沉条件为2倍95%的乙醇,静置放置16 h,备用。

1.4.2 醇提步骤:①工艺1醇提:取当归、木香、青皮、川芎4味提取挥发油。工艺条件:10倍水,提取6 h,收集的挥发油密闭保存;挥发油提取母液,水浴浓缩至药液与药材比例为1:1时,进行醇沉,醇沉条件为2倍95%乙醇,静置16 h,备用;上述4味药提取挥发油后的药渣与生地黄、赤芍、三七合并进行醇提,醇提工艺:60%乙醇提取3次,1.5 h/次,合并3次醇提液,备用;水提醇沉上清液,挥发油母液醇沉上清液及醇提液合并,回收乙醇,水浴浓缩至2.07 g生药的浸膏,即得工艺1样品溶液。②工艺2醇提:取处方量当归、木香、青皮、川芎4味提取挥发油,工艺条件:10倍水,提取6 h,收集的挥发油密闭保存;挥发油提取的母液,水浴浓缩至药液与药材比例

为1:1时,进行醇沉,醇沉条件为2倍95%的乙醇,静置16 h,备用;上述4味药提取挥发油后的药渣与生地黄、赤芍、合并进行醇提,醇提工艺:60%的乙醇提取3次,1.5 h/次,合并3次醇提液,备用;水提醇沉上清液,挥发油母液醇沉上清液及醇提液合并,回收乙醇,水浴浓缩,浓缩过程中加入三七粉,浓缩成含1.06 g生药膏,即得工艺2样品溶液。

1.5 醋酸扭体实验

取健康昆明种雄性小鼠32只,按随机数字表法分为空白组、工艺1组、工艺2组与合剂组。工艺1组灌胃2.07 g/ml工艺1样品溶液,工艺2组灌胃1.06 g/ml工艺2样品溶液,合剂组灌胃0.015 ml/g消肿止痛合剂(临床使用剂量),空白组灌胃等体积生理盐水。灌胃1次/d,连续7 d。实验前禁食12 h,末次给药后1 h按0.01 ml/g体重腹腔注射0.6%冰醋酸。观察各组出现扭体反应的时间及小鼠15 min内扭体次数,计算扭体反应抑制率。扭体反应抑制率(%)=[(空白组扭体均数-给药组扭体均数)/空白组扭体均数]×100%。

1.6 热板实验

取健康昆明种雌性小鼠32只,将智能热板仪加热至(55.0±0.5)℃。将小鼠依次放在热板仪上,按“开始”键记录时间,自放入热板仪至出现舔后足的潜伏时间(s)作为该鼠的痛阈,将痛阈<5 s或>30 s的小鼠剔除。取筛选合格的小鼠,分组与给药同“1.5”项。连续灌胃给药5 d,末次给药后1、2、3、4 h测定痛阈。为防止足部烫伤,若痛阈超过60 s,即停止测试而按60 s计,计算痛阈提高百分率。痛阈提高百分率(%)=[(给药后痛阈均值-给药前痛阈均值)/给药前痛阈均值]×100%。

1.7 小鼠耳廓肿胀实验

取健康昆明种雄性小鼠32只,分组与给药同“1.5”项。末次给药后1 h,小鼠左耳前后两面涂二甲苯0.1 ml致肿,右耳作对照。4 h后脱颈椎处死,沿耳廓基线剪下双耳,9 mm打孔器沿左、右

耳廓相同部位打一圆片,电子天平称质量,计算肿胀度及抑制率。肿胀度(%)=(左耳质量-右耳质量)/右耳质量×100%;肿胀抑制率(%)=(空白组平均肿胀度-给药组平均肿胀度)/空白组平均肿胀度×100%。

1.8 蛋清致足跖肿胀实验

取健康Wistar大鼠32只,雌雄各半,分组与给药同“1.5”项。灌胃1次/d,0.010 4 ml/g,连续7 d。末次给药后1 h,大鼠右后足跖中央皮下注射10%新鲜蛋清0.1 ml,致炎,分别于致炎前及致炎后0.5、1、2、4 h测量足跖体积,并计算各组肿胀率。肿胀率(%)=(致炎后足跖体积-致炎前足跖体积)/致炎前足跖体积×100%。

1.9 统计学方法

采用SPSS 17.0软件进行数据分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 醋酸扭体实验

与空白组比较,工艺1组、工艺2组小鼠平均扭体数减少($P < 0.01$),且均少于合剂组($P < 0.01$);工艺1组与工艺2组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),见表1。

表1 各组小鼠扭体反应抑制率比较

组别	扭体次数(次, $\bar{x} \pm s$)	扭体反应抑制率(%)
空白组	47.00±1.45	0.00
工艺1组	35.50±8.06 ^{ab}	24.47
工艺2组	35.00±7.63 ^{ab}	25.53
合剂组	45.25±8.60	3.72

注 与空白组比较,^a $P < 0.01$;与合剂组比较,^b $P < 0.01$

2.2 热板实验

与空白组比较,给药后1、2、3、4 h,工艺1组、工艺2组小鼠痛阈提高百分率升高($P < 0.01$),且均高于合剂组($P < 0.01$);工艺1组与工艺2组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),见表2。

表2 各组小鼠痛阈提高百分率比较(%, $\bar{x} \pm s$)

组别	1 h	2 h	3 h	4 h
空白组	2.10±0.80	4.77±1.45	20.57±4.27	29.02±5.55
工艺1组	21.05±3.23 ^{ab}	30.06±8.06 ^{ab}	52.33±13.61 ^{ab}	81.31±11.89 ^{ab}
工艺2组	38.60±9.53 ^{ab}	51.28±7.63 ^{ab}	72.66±7.53 ^{ab}	87.65±5.79 ^{ab}
合剂组	29.24±6.06	39.05±8.60	50.19±10.34	59.94±13.06

注 与空白组比较, ^a $P<0.01$; 与合剂组比较, ^b $P<0.05$

2.3 小鼠耳廓肿胀实验

与空白组比较, 工艺1组、工艺2组及合剂组小鼠耳廓肿胀度降低($P<0.01$); 工艺1组与工艺2组比较, 差异无统计学意义($P>0.05$), 见表3。

表3 各组小鼠耳廓肿胀抑制率比较

组别	肿胀度(%, $\bar{x} \pm s$)	肿胀抑制率(%)
空白组	73.89±15.55	0.00
工艺1组	46.31±22.25 ^{ab}	37.33
工艺2组	45.41±21.43 ^{ab}	38.55
合剂组	63.56±23.65 ^{ab}	13.99

注 与空白组比较, ^a $P<0.01$; 与合剂组比较, ^b $P<0.01$

2.4 蛋清致足跖肿胀实验

致炎后0.5、1、2、4 h, 各组大鼠足跖肿胀抑制率比较差异无统计学意义($P>0.05$), 见表4。

表4 各组大鼠足跖肿胀抑制率比较(%, $\bar{x} \pm s$)

组别	0.5 h	1 h	2 h	4 h
空白组	38.86±3.95	41.10±4.49	45.82±4.36	31.55±2.75
工艺1组	28.29±2.12	35.29±7.03	39.18±3.02	28.56±2.91
工艺2组	26.67±1.76	30.92±2.59	38.98±3.82	27.77±3.31
合剂组	31.38±2.24	36.65±2.67	41.53±4.85	31.05±5.33

3 讨论

消肿止痛合剂有消肿止痛的功效。其提取工艺为全方水提。根据现代药剂学的理论, 其处方中的当归、木香、青皮、川芎等药物采用醇提方法进行提取, 具有更好的药理活性。因此, 本研究对工艺进行改进, 并以经典的镇痛抗炎模型为评价指标, 对新工艺进行筛选。

结果表明, 工艺1样品、工艺2样品均有较好的消肿止痛作用, 且药效优于原剂型, 表明消肿止痛颗粒提取工艺设计合理。新设计的2种工艺药效学比较结果提示, 三七粉碎后直接入药其

效果更好, 提示中药粉碎直接入药有一定科学性。

本研究以药效学为指标, 筛选出了消肿止痛颗粒的最佳提取工艺, 该结果已申报专利并获得授权。本研究为消肿止痛颗粒的后续工艺优选、成型工艺研究等奠定了基础。

利益冲突声明 除基金项目支持外, 本文全体作者未接受过第三方的资助或服务, 对文中所描述的药物、材料或器械均无个人或企业的经济利益

作者贡献声明 杜茂波: 酝酿和设计实验; 刘淑芝: 对文章的知识性内容作批评性审阅; 姜华: 分析/解释数据; 李晓东: 采集数据; 沈硕: 实施研究; 姚瑶、何爱萍: 采集数据

参 考 文 献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[M]. 中国医药科技出版社, 2015.
- [2] 陈小野, 张宇鹏, 蒋小丽, 等. 热板法、醋酸扭体法疼痛模型寒、热属性的初步研究[J]. 浙江中医学院学报, 2005, 29(4): 46-51. DOI: 10.3969/j.issn.1005-5509.2005.04.032.
- [3] 刘和莉, 李月玲, 薛永志. 不同温度和醋酸浓度对小鼠扭体疼痛模型的影响[J]. 包头医学院学报, 2006, 22(2): 137-138. DOI: 10.3969/j.issn.1006-740X.2006.02.008.
- [4] 刘虎, 李洁, 王喜梅, 等. 苁蓉膏醋酸扭体法镇痛实验研究[J]. 新疆中医药, 2014, 32(2): 54-55.
- [5] 胡旭光, 杨全, 洪文, 等. 慢性内脏痛觉超敏大鼠及热板法疼痛小鼠模型对痛泻要方的镇痛反应[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2007, 11(16): 3086-3088, 3107. DOI: 10.3321/j.issn: 1673-8225.2007.16.048.
- [6] 刘岩, 苑玉和, 陈乃宏. 柴胡提取组分的镇痛作用[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2012, 26(3): 442.
- [7] 宁康健, 张婷婷. 黄芩苷对小鼠抗炎作用的研究[J]. 安徽科技学院学报, 2012, 26(6): 1-4. DOI: 10.3969/j.issn.1673-8772.2012.06.002.
- [8] 欧阳杰湖, 陈子渊, 潘善庆, 等. 骨瓜提取物注射液的生物活性测定[J]. 中南药学, 2013, 11(2): 92-95. DOI: 10.7539/j.issn.1672-2981.2013.02.004.
- [9] 丁平, 田友清, 陈国胜, 等. 香附油滴丸抗炎镇痛作用及其物质基础研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(20): 172-176. DOI: 10.11653/syfq2013200172.
- [10] 俞浩, 方艳夕, 毛斌斌, 等. 地榆炮制前后水提取物抗炎效果研究[J]. 中药材, 2014, 37(1): 34-37.
- [11] 舒孝顺, 高中洪, 杨祥良. 蒺藜醋酸乙酯提取物对大鼠和小鼠的抗炎作用[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(3): 239-243. DOI: 10.3321/j.issn: 1001-5302.2006.03.018.
- [12] 赖珍珍, 张凌, 李莹, 等. “半夏反草乌”减弱抗炎效应及其减效机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(17): 84-87.
- [13] 李盛华, 杜茂波, 谢兴文, 等. 一种具有消炎止痛作用的中药组合物的制备方法: CN201310521280.6[P]. 2015-05-06.

(收稿日期: 2018-05-10)

(本文编辑: 张琪)