

温经汤中牛膝的酒炙工艺及炮制前后药效学对比研究

李军鸽, 王永春, 赵莹, 孟珈同, 李娜, 邱智东, 唐秋竹^{*}(长春中医药大学, 长春 130117)

摘要: 目的 建立经典名方—温经汤中牛膝的酒炙工艺, 并比较炮制前后药理作用的区别。方法 结合古代和现代方法, 优选净制、润、切、干燥工艺, 采用单因素考察结合正交多指标综合评分法, 对温经汤中牛膝酒炙炮制工艺研究。通过寒凝血瘀模型的大鼠扭体反应和血液流变学检测对比炮制前后功效区别。结果 酒牛膝最佳工艺为牛膝药材净制, 抢水洗 2 次, 每次用水量约为 3~4 倍药材量, 闷润, 切短段, 低温干燥或自然晾干后, 取牛膝段 100 g 加 10 g 黄酒+水 10 g 拌匀, 闷 3 h。置 130 °C 预热炒锅内(30 r·min⁻¹), 炒制 25 min, 得酒牛膝。与模型组比较, 牛膝组与酒牛膝组全血黏度明显降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 提示酒牛膝活血化瘀作用强于牛膝。结论 炮制工艺稳定可行, 重复性良好, 温经汤以酒牛膝入药合理。

关键词: 温经汤; 牛膝; 酒炙; 活血化瘀

中图分类号: R283.3

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2023)01-0018-07

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2023.01.003

引用本文: 李军鸽, 王永春, 赵莹, 等. 温经汤中牛膝的酒炙工艺及炮制前后药效学对比研究[J]. 中国现代应用药学, 2023, 40(1): 18-24.

Comparative Study of Stir-frying with Wine Process and Pharmacodynamics Before and After Processing of Achyranthis Bidentatae Radix in Wenjing Decoction

LI Junge, WANG Yongchun, ZHAO Ying, MENG Jiatong, LI Na, QIU Zhidong, TANG Qiuzhu^{*}(Changchun University of Traditional Chinese Medicine, Changchun 130117, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish the stir-frying with wine process of Achyranthis Bidentatae Radix in the classical famous prescription of Wenjing decoction, and to compare the pharmacological effect before and after processing. **METHODS** Combined with the ancient and modern methods, the cleansing, moistening, cutting and drying process were preferred, and the one-factor investigation combined with the multi-index comprehensive scoring method was used to study the Achyranthis Bidentatae Radix processing method. The effect of the Achyranthis Bidentatae Radix before and after processing was compared by the rat torsion reaction and blood rheology. **RESULTS** The optimum stir-frying with wine process of Achyranthis Bidentatae Radix was as follows: clean Achyranthis Bidentatae Radix, wash with water quickly(water volumn was 3~4 times of the mass of herb), moisten, section, dry at low temperature or dry naturally, then take 100 g, mixed with rice wine 10 g and water 10 g, stuffy for 3 h; then stir-fry 25 min in frying pan(30 r·min⁻¹) which has preheated to 130 °C. Compared with the model group, the whole blood viscosity was significantly decreased($P<0.05$ or $P<0.01$) in Achyranthis Bidentatae Radix group and the wine-processed group, indicated that the effect of promoting blood circulation and removing blood stasis of wine stir-fried Achyranthis Bidentatae Radix was better than Achyranthis Bidentatae Radix. **CONCLUSION** The optimized process is stable and feasible with good repeatability. It's reasonable to use wine stir-fried Achyranthis Bidentatae Radix in the Wenjing decoction. **KEYWORDS:** Wenjing decoction; Achyranthis Bidentatae Radix; stir-frying with wine; activating blood circulation to dissipate blood stasis

温经汤出自宋代陈志明的《妇人大全良方》^[1], 是 2018 年 4 月国家中医药管理局同国家药品监督管理局发布的 100 首《古代经典名方目录(第一批)》中的 1 首, 温经汤原文记载“当归、川芎、芍药、桂心、莪术、牡丹皮半两, 人参、牛膝、甘草各一两, 右咬咀, 每服五钱水一盞半, 煎至八分”^[2], 功效为温经补虚, 止痛化瘀, 主治经脉不通, 血

凝不行, 绕脐寒疝。东汉张仲景《金匱要略》中也有“温经汤”记载, 其与《妇人大全良方》中个别药味不同, 《金匱要略》中记载吴茱萸 3 两, 当归、芍药、川芎、人参、桂枝、阿胶、牡丹皮、生姜、甘草各 2 两, 半夏半升, 麦冬 1 升。全方温经散寒以补养冲任而固本, 则瘀血去, 新血生, 虚热退, 月经调而病自除。《妇人大全良方》中配

基金项目: 吉林省科技发展计划项目(20200602034ZP)

作者简介: 李军鸽, 女, 硕士, 助理实验师 E-mail: 407332695@qq.com

^{*}通信作者: 唐秋竹, 女, 主任医师 E-mail: 497903433@qq.com

有莪术、牛膝，故其以活血祛瘀止痛为主^[3]。方中重用牛膝，用量为 1 两，主要功效为逐瘀通经止痛，可知牛膝入药温经汤的重要性，但方中并没有标注牛膝以炮制品入药还是生品入药。在 2020 年 6 月国家药品监督管理局公开征求《古代经典名方关键信息考证原则》和《古代经典名方关键信息表(7 首方剂)征求意见稿》中，专家认为牛膝经酒炙后药性温和，活血化瘀功效可能更佳，更贴切温经汤功效，故建议温经汤中牛膝为酒牛膝入方^[4]，同时经考证该时期所用川牛膝与今所用牛膝 *Achyranthes bidentata* Bl.基原一致，且书中总论提及“川牛膝，需酒炒”，所提的酒制加工方法与今之酒炙法相似，建议参考酒牛膝炮制方法。中药炮制是中药材制成中药饮片的过程，是使其投入临床应用的一项传统技术，是保障饮片质量稳定、安全、有效的关键^[5-6]，目前很少有文献从炮制角度出发，针对具体经典名方中某味中药的炮制方法及药效学进行研究考证。本研究以经典名方——《妇人大全良方》温经汤为例，参考古代炮制方法的同时与现代工艺结合^[7]，建立牛膝酒炙炮制工艺，通过建立大鼠寒凝血瘀模型观察扭体法和血液流变学检测药效学实验比较牛膝在炮制前后的化瘀止痛作用差异，从而为温经汤中酒牛膝入方合理性提供理论依据，也为温经汤后续开发研究提供参考。

1 仪器与试药

LC2030 高效液相色谱仪(日本岛津)，色谱柱为 Apollo C₁₈ 键合硅胶柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); KD0281 切药机(广东膳道有限责任公司); MS-5 多功能电热炒药机(通康机电); DHG-9030A 鼓风干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司); KQ-250B 超声波清洗机(昆山超声仪器有限公司); XS105DU 万分之一电子天平(瑞士梅特勒公司); TGL-16C 离心机(上海安亭科学仪器厂); MDK-B100VT 全自动血液流变测试分析仪(重庆麦迪克科技开发有限公司)。

β-蜕皮甾酮对照品(中国食品药品检定研究院，批号：111638-201907); 黄酒(酒精度 15%，绍兴吴越酿酒有限公司，批号：20210120); 缩宫素注射液(江西博莱大药厂有限公司，批号：20210511); 苯甲酸雌二醇(宁波第二激素厂，批号：20200915); 水合氯醛(山东普惠分化学科技有限公

司，批号：20210322); 盐酸肾上腺素(上海全宇生物科技动物药业有限公司，批号：20200401); 乙腈(色谱纯，Fisher); 水为超纯水; 牛膝药材均购于吉林省北药药材加工有限公司，经长春中医药大学翁丽丽教授鉴定为苋科植物牛膝 *Achyranthes bidentata* Bl.的干燥根。药材来源信息见表 1。

健康雌性大鼠，40 只，体质量：180~200 g; 动物生产许可证号：SCXK(吉)2021-0001(长春市亿斯实验动物技术有限责任公司)。

表 1 药材来源信息

Tab. 1 Source information of medicinal materials

批号	产地	采收期	加工方式
NX202001	河南焦作市武陟县	2019 年 11 月	晒干
NX202002	河南孟州市南庄镇	2019 年 11 月	晒干
NX202003	河南温县武德镇	2019 年 11 月	晒干
NX202004	河南范县高码头镇	2019 年 12 月	晒干

2 酒牛膝炮制方法考证

牛膝又名怀牛膝、牛髀膝、山苋菜，其药用最早始于《神农本草经》^[8]，具有“逐瘀通经，补肝肾，强筋骨，利尿通淋，引血下行”功效。牛膝炮制历史悠久，除了酒制还有焙制、炒制、药汁制、盐制、炭制等方法，酒牛膝早在汉代《华氏中藏经》^[9]记载“酒浸焙”。晋《肘后方》^[10]记载“取牛膝酒渍，含渐之，无酒者，空含亦佳”; 南北朝《雷公炮炙论》^[11]记载“凡使，去头并尘土了，用黄精自然汁浸一宿，漉出，细锉，焙干用之”; 唐《千金方》^[12]记载“牛膝五两，酒三升，煮取一升半，去滓”; 宋《本草图经》^[13]记载“取茎叶一把，切，以酒三升渍服”; 宋《太平惠民和剂局方》^[14]记载“用酒浸蒸过使”; 宋《校注妇人良方》^[15]记载“酒拌炒”; 明《本草纲目》^[16]“今惟以酒浸入药，欲下行则生用，滋补则焙用，或酒拌蒸过用。”明《炮炙大法》^[17]记载“酒浸蒸晒干”; 清《外科大成》^[18]记载“酒浸”。可见酒牛膝的相关炮制方法在历代各医家典籍里都有记载; 现代酒牛膝在中国药典 2020 年版一部收载的炮制方法为“净牛膝段，加黄酒拌匀，闷透，内置炒制容器，用文火炒干^[19]”。饮片性状“形如牛膝段，表面色略深，偶见焦斑。微有酒香气。”同时各地方标准也收录酒牛膝饮片炮制规范，并对其入药规格有所规定，如广西、江苏、江西收记“取牛膝，加黄酒拌匀，待酒吸尽，置锅内，用

文火炒干,取出放凉,每100 kg牛膝,用酒10 kg”规格为短段,湖南炮制规范中要求长段;结合酒牛膝古代用药方式考证和目前全国各地加工炮制情况及现代实验研究^[20-24],对牛膝药材酒炙做如下关键工艺研究:净制、软化、切、干燥、黄酒拌匀、闷透、文火炒干共7个方面进行方法工艺优化研究。

3 方法与结果

3.1 净制方法研究

牛膝净制方法早在南北朝时期的《雷公炮炙论》中记载“凡使,去头并尘土了”,使用牛膝时,去芦头和附着在药材表面的泥土使其净制。后来《普济方》也有“水洗”记载。现代在中国药典2020年版一部收录的净制方法为“去除杂质,洗净”。故取牛膝药材(批号: NX202001),除去杂质,称重,抢水洗。记录用水量和洗涤次数。以水洗后水颜色浑浊程度为洗净依据,最后确定抢水洗2次,每次用水量约为3~4倍药材量可得到干净的药材。

3.2 软化方法研究

古代关于牛膝软化的方法有很多,如《雷公炮炙论》中记载“用黄精自然汁浸一宿,漉出”,后有“用生地黄汁五斤,浸一宿”“用酱水浸一宿时”“茶水浸”“甘草水泡”等方法,结合全国各省炮制规范中牛膝软化方法多为润制,“润透”为止,即内外软硬一致,也有“弯而不折”即可。牛膝药材易受潮,受潮后易变软,故研究采用常温闷润的方式进行软化药材,将洗净的药材用湿布包裹放于容器内,保持湿布湿润,待药材内外软硬一致,当手握药材,大拇指用力使药材“弯而不折”,即为润好,记录润透时间(h),含水率(%).结果常温闷润时间需3~4 h,含水率8%~10%。

3.3 切制方法研究

古代文献在牛膝切制方面有“细锉”“咬咀”“切作细段”“捣碎”等方法,经查中国药典2020年版四部通则0213,段可分为长段(10~15 mm)和短段(5~10 mm),结合全国各省炮制规范牛膝都为切段,规格有长段和短段,北京炮制规范要求切中段。考虑温经汤原文记载“右咬咀”,因药材最终需“咬咀”,经考证“咬咀”以口咬如麻豆大小^[25],即粒度为4~6 mm左右,故选择牛膝切制规格为短段。

3.4 干燥方法研究

古代文献在牛膝干燥方面记载主要有“焙干”

“晒干”“炒干”方法,但具体干燥温度并没有记载,结合现代文献研究,可考察不同干燥方式和干燥温度。取4份闷润好的药材(批号: NX202001)切短段后,分别选择40, 60, 80℃烘干及自然晾干,记录饮片的外观性状、 β -蜕皮甾酮含量、浸出物、水分、干燥时间。结果40℃烘干需要7 h,水分为9.7%, β -蜕皮甾酮含量为0.089%,浸出物为8.4%;60℃烘干需要5 h,水分为8.6%, β -蜕皮甾酮含量为0.081%,浸出物为7.7%;80℃烘干需要7 h,水分为6.7%, β -蜕皮甾酮含量为0.086%,浸出物为7.9%;自然晾干需要48 h,水分为8.7%, β -蜕皮甾酮含量为0.084%,浸出物为8.2%。干燥方式及温度对牛膝饮片性状、 β -蜕皮甾酮含量、浸出物影响并不大,80℃干燥时间并没有缩短,原因是牛膝易受潮,在高温干燥,水分蒸发的同时,由于烘箱密闭,部分水蒸气又被药材返吸,致使饮片干燥不完全,干燥时间延长,因此干燥方式可选择低温干燥(40~60℃)或自然晾干。

3.5 黄酒拌匀、闷润及文火炒干方法研究

古代关于牛膝酒炙的记载有“酒拌炒”“酒拌蒸”“酒浸,微炒”,没有标注用什么酒,更没有标注酒的纯度,经查阅《中药炮制学》^[26],酒为黄酒,酒精度为15%左右, $\leq 20\%$ 。结合中国药典2020年版四部通则0213规定“酒炙时,除另有规定外一般用黄酒,每100 kg待炮炙品用黄酒10~20 kg”。故采用单因素考察法优选黄酒用量,采用正交试验多指标综合评分法,优选最佳酒炙工艺。

3.5.1 黄酒用量考察 取5份牛膝饮片,每份100 g,分别加10 g黄酒,15 g黄酒,20 g黄酒,10 g黄酒+10 g水混合,15 g黄酒+5 g水混合,拌匀,闷润。记录闷润状态,闷润时间(h),在130℃(锅转速30 r·min⁻¹)炒锅内炒25 min,得到酒牛膝,按中国药典2020年版一部“牛膝”【浸出物】、【含量测定】项下方法测定浸出物和 β -蜕皮甾酮含量,确定黄酒用量,结果见表2。100 g牛膝段至少要20 g的溶液去拌匀,润透,相同条件下文火炒干后, β -蜕皮甾酮含量和浸出物含量无明显差别。说明黄酒用量对酒牛膝有效成分含量影响不大,从节约经济成本考虑,可选10 g黄酒+10 g水混合,因此100 g牛膝段可用10 g黄酒+10 g水混合拌匀,闷3 h。

表 2 黄酒用量考察结果

Tab. 2 Results of rice wine consumption

序号	牛膝段/g	黄酒量	是否拌匀	闷润时间/h	浸出物/%	β-蜕皮甾酮含量/%
1	100	10 g	黄酒量不够, 未能拌匀闷透	—	—	—
2	100	15 g	黄酒量不够, 未能拌匀闷透	—	—	—
3	100	20 g	拌匀, 闷透	3	8.5	0.086
4	100	10 g 黄酒+10 g 水混合	拌匀, 闷透	3	8.9	0.084
5	100	15 g 黄酒+5 g 水混合	拌匀, 闷透	3	8.2	0.084

3.5.2 文火炒干工艺研究 结合炙法操作要点“文火炒干”,设计炒制温度选择 110, 130, 150 °C 三水平;炒制时间选取 20, 25, 30 min 三水平;实际生产情况调研炒锅转速选择 20, 25, 30 r·min⁻¹,对三因素三水平进行整理,见表 3,利用正交 L₉(3⁴)试验表设计正交实验。取净牛膝段 9 份,每份 100 g。10 g 黄酒+10 g 水混合拌匀,闷 3 h。置于预热炒锅内,按规定炒制温度(°C)、炒锅转速(r·min⁻¹)、炒制规定时间(min)制备炮制品,取出,放凉。

表 3 正交试验因素水平表

Tab. 3 Orthogonal tes of factor level table

水平	A 炒制温度/°C	B 炒制时间/min	C 炒锅转速/r·min ⁻¹
1	110	20	20
2	130	25	25
3	150	30	30

3.5.3 炮制品质量指标分析 外观性状 中国药典 2020 年版一部“酒牛膝”【性状】:形如牛膝段,表面色略深,偶见焦斑。微有酒香气。炒制适度值定为 1~10 分,设定评分标准,对 1~9 号正交试验酒牛膝样品进行评分。水分、β-蜕皮甾酮、浸出物含量按中国药典 2020 年版四部通则 0832 水分测定法(第二法)对 9 个正交试验样品进行水分测定。按照中国药典 2020 年版一部“牛膝”【浸出物】、【含量测定】项下方法,测定 9 个正交试验样品浸出物,采用高效液相色谱法测定 β-蜕皮甾酮含量。β-蜕皮甾酮属于甾酮类化合物,该化合物被认为是牛膝的第一类活性成分,具有抗血小板聚集,促进血液循环,改善血管痉挛的药理活性,与牛膝功效中的活血化瘀相对应^[27],同时以 β-蜕皮甾酮为指标对牛膝进行质量控制比较常见。

3.5.4 正交试验结果与方差分析 参考文献^[28]采用熵权法对性状(Y₁)、水分(Y₂)、浸出物(Y₃)、β-蜕皮甾酮含量(Y₄)评价指标进行权重系数分配,计算综合评分。首先需将各指标进行归一化处理。即 β-

蜕皮甾酮含量、浸出物和外观性状评分指标取值越大越好($d_{\max}$),水分含量取值越小越好($d_{\min}$),公式 $d_{\max}=(Y_i-Y_{\min})/(Y_{\max}-Y_{\min})$, $d_{\min}=(Y_{\max}-Y_i)/(Y_{\max}-Y_{\min})$, $Y_{\min}$ 为指标中最小值, $Y_{\max}$ 为指标中最大值。

再根据公式 $f_i = \frac{x_i}{\sum_{i=1}^m x_i}$, $H_i = -\frac{1}{\ln m} \sum f_i \ln f_i$ 和

$w_i = \frac{1-H_i}{n-\sum_{i=1}^n H_i}$ 确定指标权重,其中 f 为指标比重,

H 为熵, w 为指标权重。经熵权法计算得到的评价结果更加客观、真实。按上述公式计算性状(Y_1)、水分(Y_2)、浸出物(Y_3)、β-蜕皮甾酮含量(Y_4) 4 项指标组合权重系数分别为 0.406, 0.162, 0.382, 0.050。综合评分 = $(Y_1/Y_{1\max} \times 0.406 + Y_2/Y_{2\max} \times 0.162 + Y_3/Y_{3\max} \times 0.382 + Y_4/Y_{4\max} \times 0.050) \times 100\%$ 。将综合评分导入正交表,结果正交试验分析见表 4。方差分析见表 5。

表 4 分析结果可知,因素 A(炒制温度)结果为 $A_2 > A_3 > A_1$; 因素 B(炒制时间)结果为 $B_2 > B_3 > B_1$; 因素 C(炒锅转速)为 $C_3 > C_2 > C_1$ 。表 5 方差分析可知:正交试验因素 A(炒制温度)有显著性差异,因素 B 和 C 没有显著性差异。即炒制温度对结果影响最大,炒制时间和炒锅转速对结果影响不大。故最佳酒炙炮制工艺条件是 $A_2B_2C_3$,即将牛膝段每份 100 g 加 10 g 黄酒+10 g 水混合拌匀,闷 3 h。置 130 °C 预热炒锅内(炒锅转速为 30 r·min⁻¹),炒制 25 min。

$A_2B_2C_3$ 工艺条件的酒牛膝与未经酒炙的牛膝段理化指标结果比较见表 6,性状上差别很大,水分和浸出物差别不大,从 β-蜕皮甾酮含量看,酒牛膝中 β-蜕皮甾酮含量略有增加,可能与酒炙过程中酒能升能散,增加化学成分的溶出有关^[29-30]。

3.6 酒牛膝炮制工艺确定及工艺验证

结合上述研究结果,温经汤中酒牛膝工艺为牛膝药材除去杂质,抢水洗 2 次(用水量约为 3~4 倍药材量)。常温闷润,润透即止,切短段,低温

表 4 正交试验结果与分析

Tab. 4 Orthogonal test results and analysis

试验号	A/℃	B/min	C/r·min ⁻¹	空	性状	水分/%	浸出物/%	β-蜕皮甾酮/%	综合评分
1	1(110)	1(20)	1(20)	1	2	12.0	8.2	0.084	37.82
2	1	2(25)	2(25)	2	5	11.5	8.5	0.086	60.75
3	1	3(30)	3(30)	3	5	11.0	8.7	0.082	61.73
4	2(130)	1	2	3	10	11.8	8.9	0.079	94.96
5	2	2	3	1	10	9.8	8.4	0.089	99.06
6	2	3	1	2	9	9.6	7.5	0.086	96.53
7	3(150)	1	3	2	5	10.4	7.8	0.081	95.73
8	3	2	1	3	3	9.9	7.9	0.085	96.34
9	3	3	2	1	2	8.5	7.9	0.080	95.83
K1	160.31	228.52	230.69	232.72					
K2	290.55	256.15	251.55	253.02					
K3	287.91	254.10	256.53	253.03					
R	43.42	9.21	8.61	6.77					

表 5 正交试验方差分析

Tab. 5 Orthogonal test variance analysis

方差来源(因素)	偏差平方和	自由度	F 值	显著性
A	3 694.658 4	2	40.3064	P<0.05
B	157.968 4	2	1.7233	
C	125.223 4	2	1.3661	
空(误差)	91.664 4	2		

干燥(40~60℃)或自然晾干后,取牛膝段每份 100 g 加 10 g 黄酒+水 10 g 拌匀,闷 3 h。置 130℃预热炒锅内(转速 30 r·min⁻¹),炒制 25 min,即得。

取牛膝药材 3 批(批号: NX202002, NX202003, NX202004),按炮制工艺进行洗、润、切、干燥、酒炙等工序验证。炮制后酒牛膝饮片质量均符合

表 7 工艺验证试验结果

Tab. 7 Process verification test results

批号	外观性状	水分	β-蜕皮甾酮	浸出物	饮片合格率 %
NX202002 酒牛膝	形如牛膝段,表面色略深,偶见焦斑,微有酒香气	8.9	0.084	8.8	95.55
NX202003 酒牛膝		9.4	0.092	8.0	96.68
NX202004 酒牛膝		9.6	0.086	7.5	96.23



图 1 牛膝(A)和酒牛膝(B~D)图

A-批号: NX202002; B~D-批号: NX202002, NX202003, NX202004。

Fig. 1 Map of Achyranthis Bidentatae Badix and its rice wine stir-fried products

A-Batch No. NX202002; B-D-Batch No. NX202002, NX202003, NX202004.

表 6 最佳工艺牛膝及其酒炙品理化指标比较结果

Tab. 6 Comparison of physical and chemical indexes of best process of Achyranthis Bidentatae Badix and its rice wine stir-fried products

样品	性状	水分/%	浸出物 /%	β-蜕皮甾酮/%
牛膝	呈圆柱形的段。外表皮灰黄色,质硬脆,易折断,受潮变软	8.4	8.1	0.080
酒牛膝	形如牛膝段,表面色略深,偶见焦斑,微有酒香气	9.8	8.6	0.089

要求,说明该工艺稳定可靠。结果见表 7、图 1。

3.7 对大鼠扭体反应和血液流变学检测比较

采用 SPSS 19.0 统计软件进行分析,实验结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间均数比较采用方差分析,以 $P<0.05$ 表示差异有显著统计学意义, $P<0.01$ 表

示差异有极显著统计学意义。

3.7.1 分组与造模 参照文献[31],对大鼠进行寒凝血瘀造模与治疗研究。健康雌性未孕大鼠 40 只,体质量 180~220 g,随机分为 4 组,即正常组、模型组、牛膝组、酒牛膝组,每组 10 只,除正常组外,其他组大鼠皮下注射苯甲酸雌二醇($2\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$),每天 1 次,连续 10 d,同时每天将大鼠四肢和腹部泡于冰水浴中($0\sim 4\text{ }^{\circ}\text{C}$)10 min,造模后大鼠出现寒颤,弓背竖毛,耳尾爪苍白,反应迟钝,大便稀溏症状,说明造模成功。于造模第 5 天起,灌胃给药,牛膝组和酒牛膝组分别给予 $2\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 牛膝水煎液和酒牛膝水煎液(取牛膝段或酒牛膝段 100 g,加水 800 mL 煎煮 20 min,浓缩至 100 mL 即得),正常组和模型组给予等体积蒸馏水,每天 1 次,连续给药 7 d,末次给药后腹腔注射催产素(每只 2 U)。

3.7.2 扭体反应检测 观察注射完催产素 15 min 的扭体反应,记录大鼠扭体次数,见表 8。与正常组比较,模型组扭转次数增加($P<0.01$),与模型组比较,牛膝组和酒牛膝组能够明显减少催产素所致的大鼠扭体反应次数,延长痛觉($P<0.01$),且 2 组没有明显差异,说明牛膝和酒牛膝均有明显的镇痛作用,二者镇痛作用无明显差异。

表 8 各组大鼠扭体法镇痛作用比较($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

Tab. 8 Comparison of analgesic effects of rat torsion method in each group($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

组别	给药量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	15 min 内扭体次数/次
正常组	—	0.0 ± 0.00
模型组	—	$8.54\pm 1.63^{1)}$
牛膝组	2	$4.60\pm 0.84^{2)}$
酒牛膝组	2	$4.47\pm 1.22^{2)}$

注:与正常组比, $^{1)}P<0.01$;与模型组比, $^{2)}P<0.01$ 。

Note: Compared with normal group, $^{1)}P<0.01$; compared with model group, $^{2)}P<0.01$.

3.7.3 血液流变学检测 大鼠处死前禁食 12 h,末次给药后,各组大鼠腹腔注射 3%水合氯醛麻醉,腹主动脉取血,取 5 mL 血于预先用肝素处理过的离心管中,进行血液流变学检测^[32],结果见表 9。与正常组比较,模型组全血黏度(低、中、高)明显增高($P<0.01$),血瘀模型复制成功;与模型组比较,牛膝组与酒牛膝组全血黏度明显降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),提示酒牛膝活血化瘀作用强于牛膝。

表 9 各组大鼠血液流变学比较($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

Tab. 9 Comparison of blood rheology in rats of each group($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

组别	给药量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	全血低切黏度 ($3\cdot\text{s}^{-1}$)/ $\text{mPa}\cdot\text{s}$	全血中切黏度 ($70\cdot\text{s}^{-1}$)/ $\text{mPa}\cdot\text{s}$	全血高切黏度 ($200\cdot\text{s}^{-1}$)/ $\text{mPa}\cdot\text{s}$
正常组	—	6.65 ± 10.00	2.86 ± 0.90	2.85 ± 1.11
模型组	—	$8.03\pm 1.06^{1)}$	$5.84\pm 1.1^{1)}$	$4.58\pm 2.73^{1)}$
牛膝组	2	$7.44\pm 1.15^{3)}$	$4.53\pm 0.80^{3)}$	$3.90\pm 1.38^{3)}$
酒牛膝组	2	$6.62\pm 1.77^{2)}$	$3.45\pm 1.2^{2)}$	$3.12\pm 1.47^{2)}$

注:与正常组比, $^{1)}P<0.01$;与模型组比, $^{2)}P<0.01$, $^{3)}P<0.05$ 。

Note: Compared with normal group, $^{1)}P<0.01$; compared with model group, $^{2)}P<0.01$, $^{3)}P<0.05$.

4 讨论

温经汤中牛膝的酒炙工艺确定为药材除去杂质,抢水洗 2 次(用水量约为 3~4 倍药材量),常温闷润,润透即止,切短段,低温干燥($40\sim 60\text{ }^{\circ}\text{C}$)或者自然晾干后,取牛膝段每份 100 g 加 10 g 黄酒+10 g 水混合拌匀,闷 3 h,置 $130\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预热炒锅内(转速为 $30\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$),炒制 25 min,即得。工艺中净制过程采用抢水洗,即快速洗涤,及时取出,防止药材与水接触时间长,水溶性成分损失,故洗的时间控制在 20 s 内。中药饮片在切制前需要润,一般用水处理进行药材软化,需要计算并控制含水率,特别是有效成分易溶于水的药材,含水率/%=(软化后药材质量-净制后药材质量)/净制后药材质量,药材炮制讲究七分润,三分切,润的过程中含水率较高,药材过软,切的时候易黏刀,出现软绵绵的现象,得到的饮片成型不好。含水率过低,药材润不透,会有硬芯,不便于切制,预实验结果牛膝润后含水率 8%~10%,便于切制,得到的牛膝段符合要求,且浸出物和 β -蜕皮甾酮含量几乎没有变化。考虑温经汤原文提到“咬咀”,即粒度为 4~6 mm 左右,故选择牛膝切制规格为短段。古代干燥记载主要为“暴晒、焙干、炒干”方式,并没有具体干燥的温度,本研究对不同干燥方式和温度进行考察研究,最终确定低温干燥($40\sim 60\text{ }^{\circ}\text{C}$)或自然晾干,操作简单。通过正交试验,以性状、水分、浸出物、 β -蜕皮甾酮含量为指标进行综合评分,优选“文火炒干”工艺,最终确定最佳酒牛膝的炮制工艺。后期课题组又对 15 批牛膝进行了酒牛膝工艺验证,发现该工艺方法可靠可行。

温经汤主治经脉不通,血凝不行,绕脐寒疝。临床以寒凝血瘀最为常见^[33]。大鼠扭体反应和血液流变学检测研究结果表明,牛膝和酒牛膝二者

均有逐瘀止痛的作用,但在活血化瘀作用方面酒牛膝优于牛膝,本研究通过药效学实验为牛膝经酒炮制后增强活血化瘀作用提供实验依据,从而更有力地证明温经汤中牛膝以酒牛膝入药的合理性,也为温经汤后续研究提供基础。

后期课题组还将继续研究温经汤中其他药材饮片或炮制品入方的实验依据,以及相关药材饮片炮制方法不同对温经汤药效的影响。经典名方流传久远,开发经典名方具有重大意义,目前还有很多问题存在争议,如药材基原、药材炮制品选择、药材用量及服用剂量等方面,这些问题都是源头问题,都需要认真考证,反复研究。从入方药材及其炮制品出发对经典名方进行研究,对发展和传承经典名方具有较好的意义。

REFERENCES

- [1] (宋)陈自明. 妇人大全良方[M]. 王咪咪, 整理. 北京: 人民卫生出版社, 2006.
- [2] 国家中医药管理局. 古代经典名方目录[S]. 2018-04-13.
- [3] HUANG J, ZHU M, CHEN Y. Clinical application of major Wenjing decoction and minor Wenjing decoction in treating dysmenorrhea with syndrome of cold accumulation and blood stasis[J]. J Guangzhou Univ Tradit Chin Med(广州中医药大学学报), 2020, 7(37): 1395-1398.
- [4] 国家中医药管理局. 古代经典名方关键信息考证原则[S]. 2020-10-15.
- [5] ZHANG L. Discussion on classification of Chinese crude drugs processing methods in "General Principles for Processing" of Chinese pharmacopoeia[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2020, 37(18): 2287-2290.
- [6] QIN K M, CAI B C. Some key problems during quality standard research of pieces of Chinese crude drugs[J]. Mod Tradit Chin Med Mater Med-World Sci Technol(世界科学技术-中医药现代化), 2014, 16(3): 519-525.
- [7] 于澎, 熊金璐, 宋来辉, 等. 泻白散中桑白皮的尊古炮制及现代工艺研究[J]. 时珍国医国药, 2020, 31(10): 2383-2386.
- [8] 魏吴普等. 神农本草经[M]. 南宁: 广西科学技术出版社, 2016.
- [9] (东汉)华佗. 华氏中藏经[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2018: 16.
- [10] (晋)葛洪. 肘后备急方[M]. 影印本. 广州: 广东科技出版社, 2016: 35.
- [11] 雷敦. 雷公炮炙论[M]. 上海: 上海中医学院出版社, 1986: 19.
- [12] 孙思邈. 备急千金要方[M]. 太原: 山西科学技术出版社, 2010: 22.
- [13] (宋)苏颂. 本草图经[M]. 尚志钧辑校. 合肥: 安徽科学技术出版社, 1994: 21.
- [14] (宋)太平惠民和剂局. 太平惠民和剂局方[M]. 刘景源整理. 北京: 人民卫生出版社, 2007: 26.
- [15] (宋)陈自明. 校注妇人良方[M]. 上海: 上海卫生出版社, 1956: 46.
- [16] (明)李时珍. 本草纲目[M]. 马美著校点. 武汉: 崇文书局, 2017: 49.
- [17] (明)缪希雍. 炮炙大法[M]. 影印本. 北京: 人民卫生出版社, 1956: 25.
- [18] (清)祁坤. 外科大成: 四卷[M]. 新 1 版. 上海: 上海卫生出版社, 1957: 68.
- [19] 中国药典. 一部[S]. 2020: 74.
- [20] 杨志雄, 郑俊. 牛膝炮制的综述[J]. 广西中医学院学报, 2008, 11(2): 79-81.
- [21] SHI C G. Research on processing process and quality standard of Sichuan knee[D]. Chengdu: Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, 2019.
- [22] LI W S, CHEN X, LI B, et al. Study on processing technology of cyathula of ficinalis with orthogonal experimental design[J]. Res Pract Chin Med(现代中药研究与实践), 2005, 19(4): 54-56.
- [23] TU W Q, ZHANG L J, LIU X M, et al. Optimization of wine-processing technology of Achyranthis Bidentatae Radix by orthogonal test with multi-indexes[J]. J Chin Med Mater(中药材), 2018, 41(7): 1589-1592.
- [24] 朱京祎, 杨玉琴, 田源红, 等. 综合评价法优化牛膝酒炙工艺[J]. 中药材, 2009, 32(3): 342-344.
- [25] CHEN J, ZHANG Y, CUI X B, et al. Preparation technology study of classical famous prescription of Wenjing decoction based on multi-component quality control[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2021, 52(2): 404-412.
- [26] 吴皓, 李飞. 中药炮制学[M]. 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2016.
- [27] LUO Y F, OUYANG W, TANG D F, et al. Research progress of material basis and pharmacological effects of saponins and sterones in Achyranthes[J]. Mod Chin Med(中国现代中药), 2020, 22(12): 2122-2136.
- [28] TANG L, PENG Y, LEI C, et al. Optimization of extraction process of jingfang children oral liquid with orthogonal test based on information entropy theory[J]. Chin J Inf Tradit Chin Med(中国中医药信息杂志), 2018, 25(10): 91-95.
- [29] WU G X, ZHANG Z L. Effect of different types of ethanol processing method on fingerprint of medicinal Cyathula root[J]. World Chin Med(世界中医药), 2017, 12(6): 1443-1446.
- [30] TAO Y, DU Y S, HUANG S R, et al. Analysis of chemical constituents in different processed products of Achyranthis Bidentatae Radix by UPLC-Q-TOF/MS[J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2017, 23(12): 1-5.
- [31] WU S, WANG M M, PENG D Y, et al. Therapeutic effect and mechanism of Taohong Siwu granule on rats with dysmenorrhea due to cold coagulation and blood stasis[J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2020, 26(14): 111-116.
- [32] ZHUANG R X, XI J J, SHI T T, et al. Effects of activated carbon N-acetylcysteine microcapsule on hemorheology in rats with non-alcoholic fatty liver disease[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2021, 38(8): 934-937.
- [33] WU X H, YANG N L, SUN Z, et al. Experimental research of "Guizhi Fuling Pills" for the treatment of dysmenorrhea of blood stasis type[J]. Shanghai J Tradit Chin Med(上海中医药杂志), 2015, 5(49): 102-105.

收稿日期: 2021-11-22

(本文责编: 陈怡心)