

分类号：

学 号： 20212115043

密 级：内部★1年

单位代码：10759

石河子大学

硕士学位论文



古代经典名方买朱尼吾西拜物质基准研究

学 位 申 请 人

李剑郡

指 导 教 师

马芹 正高级工程师

申请学位类别

药学硕士

专 业 名 称

药学

研 究 领 域

新疆植物药特色资源与利用

所 在 学 院

药学院

中国·新疆·石河子

2024年5月

分类号：
学 号： 20212115043

密 级：内部★1 年
单位代码：10759

石河子大学
硕士学位论文



古代经典名方买朱尼吾西拜物质基准研究

学 位 申 请 人	李剑郡
指 导 教 师	马芹 正高级工程师
申请学位类别	药学硕士
专 业 名 称	药学
研 究 领 域	新疆植物药特色资源与利用
所 在 学 院	药学院

中国·新疆·石河子
2024 年 5 月

Ancient classic name of Juni Wusibai material benchmark study

A Dissertation Submitted to

Shihezi University

In Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of

Master of Pharmacy

By

Li Jianjun

(Pharmacy)

Dissertation Supervisor: SN ENGR. Ma Qin

May, 2024

石河子大学学位论文独创性声明及使用授权声明

学位论文独创性声明

本人所呈交的学位论文是在我导师的指导下进行的研究工作及取得的研究成果。据我所知，除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含其他个人已经发表或撰写过的研究成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中作了明确的说明并表示谢意。

研究生签名：李剑郡

时间：2024年5月15日

使用授权声明

本人完全了解石河子大学有关保留、使用学位论文的规定，学校有权保留学位论文并向国家主管部门或指定机构送交论文的电子版和纸质版。有权将学位论文在学校图书馆保存并允许被查阅。有权自行或许可他人将学位论文编入有关数据库提供检索服务。有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

研究生签名：李剑郡

时间：2024年5月15日

导师签名：马芳

时间：2024年5月15日

摘要

目的：买朱尼吾西拜出自《卡拉巴丁艾再木》（公元 1785-1875 年，穆哈穆德·艾扎木汗），为古代经典名方目录（第二批）入选品种。处方由欧菝葜根、地锦草、诃子、番泻叶等共 10 味药材组成，具有清除异常脾液质和异常黏液质，治疗尿路炎症的作用。本课题按照中药注册分类中“3.1 类按古代经典名方目录管理的中药复方制剂”的相关要求，开展买朱尼吾西拜物质基准研究，包括药材质量研究、饮片炮制研究、制备工艺研究、质量标准建立和药效学研究。旨在将其开发成一个独具特色的治疗尿路感染的经典名方，为维药经典名方买朱尼吾西拜的注册申报建立基础。

方法：（1）药材研究：包括关键信息考察、药材质量检查、药材质量提升等。依据 2020 版《中国药典》与《卫生部部颁标准》等标准，对买朱尼吾西拜组方中收集到的所有批次药材进行质量分析。在原有质量标准上，结合最新文献资料，开展药材标准提升研究，增加单/多成分含量测定、薄层鉴别、灰分、浸出物等质量控制指标，并根据多批次的研究结果制定企业内控标准。（2）毛诃子炒制工艺研究：采用单因素实验法，监测毛诃子中主要成分总皂苷的含量变化，考察确定炒制温度、炒制时间、料液比等关键参数，建立炮制工艺并进行验证，同时进行性状、鉴别、检查、含量测定等多项目研究，建立饮片质量标准。（3）物质基准样品制备研究：包括粉碎工艺与混合工艺。比较单独粉碎方式和串碾粉碎对中间体粉末出粉率、粉体粒径等指标的影响，确定合适的粉碎方式。比较不同混合次数下中间体粉末中安石榴苷、鞣花酸的含量并计算 RSD 值，选出最佳混合工艺。结合粉碎与混合工艺对十批次的物质基准样品进行质量研究。（4）药效学研究：包括体外抑菌活性研究及体内 UTI 尿路感染动物实验，采用琼脂倍比稀释法测定买朱尼吾西拜全方及欧菝葜根、地锦草、番泻叶对三种尿道感染菌的 MIC 值。建立大肠埃希菌急性尿路感染小鼠模型，考察不同剂量买朱尼吾西拜对小鼠一般状态、尿细菌培养的影响，评价其治疗尿路感染的作用。

结果：（1）药材质量检查：共收集到 162 批药材，经检查 155 批药材合格，7 批次不合格。其中 2 批毛诃子，2 批诃子性状外观不合格，2 批地锦草灰分不合格，1 批余甘子含量不合格。（2）毛诃子炒制工艺：炒制 30 min 后，毛诃子黄度值、三种鞣质类成分含量最高，总皂苷含量变化趋于平缓，不再下降。（3）物质基准样品制备：全药材 1/6 处方量粉碎 20 min 并混合 10 次为最佳制备工艺。以最佳工艺进行十批次的物质基准样品研究，验证后工艺稳定可行。（4）药效学结果：买朱尼吾西拜对三种常见尿道菌抑菌效果明显，尿路感染 UTI 动物模型买朱尼吾西拜中、高剂量组对小鼠尿路感染具有一定的治疗效果。

结论：买朱尼吾西拜组方药材合格率高；毛诃子经炮制后总皂苷含量下降，药效成分增加。炮制工艺、物质基准样品研究、经验证后稳定；买朱尼吾西拜抑菌效果明显，对 UTI 尿路感染疗效显著。可为买朱尼吾西拜后续开发研究提供基础。

关键词：经典名方；尿路感染；工艺；质量标准

Abstract

Object: Maizhuniwuxibai is from Kalabadin Aizamu (1785-1875 A.D., Muhammad Aizamu Khan), an entry in the Catalog of Ancient Classical Formulas (second batch). The prescription consists of a total of 10 herbs, including Sarsaparilla Ovata Root, Humifuse Euphorbia Herb, Chebulin, and Senna Leaf, which have the effect of removing abnormal splenic and abnormal mucus matter and treating inflammation of the urinary tract. According to the requirements of "Class 3.1 Compound Preparations of Traditional Chinese Medicines Managed According to the Catalog of Ancient Classical Formulas" in the Classification of Traditional Chinese Medicines Registration, this project is to carry out the research on the material baseline of Buizhu Nyusibai, which includes the quality of medicinal materials, concoctions of drinking tablets, preparation process, establishment of quality standards, and pharmacodynamic studies. The aim is to develop it into a unique classic formula for treating urinary tract infections, and to establish a foundation for the registration of Maizhuniwuxibai, a classic prescription of Uyghur medicine.

Methods: (1) Research on herbs: including key information examination, quality check of herbs, and quality improvement of herbs. Based on the 2020 edition of the Chinese Pharmacopoeia and the Ministry of Health Standards and other standards, we analyzed the quality of all batches of medicinal herbs collected in the Maizhuniwuxibai Formulas. On the basis of the original quality standards, combining with the latest literature, we carried out research on the standard improvement of the herbs, added quality control indexes such as single/multiple ingredient content determination, thin-layer identification, ash, leachate, etc., and formulated the internal control standards of the enterprise based on the results of the research on multiple batches. (2) Study on the frying process of Quixote: A single-factor experimental method was used to monitor the changes in the content of total saponin, the main component in Quixote, to determine the frying temperature, frying time, material-liquid ratio and other key parameters, to establish and validate the concocting process, and at the same time to carry out a multi-factor study on the traits, identification, inspection, content determination and other research projects, and to establish a quality standard for the drinking tablets. (3) Substance reference sample preparation study: including pulverization and mixing processes. Compare the effects of individual pulverization and tandem pulverization on the powder yield and particle size of the intermediate powder, and determine the appropriate pulverization method. Compare the content of andrographolide and ellagic acid in the intermediate powder under different mixing times and calculate the RSD value to select the best mixing process. The quality of ten batches of reference samples of the substance was studied by combining the pulverization and mixing processes. (4) Pharmacodynamics research: including in vitro bacteriostatic activity research and in vivo UTI urinary tract infection animal experiments, using agar doubled dilution method to determine the MIC value of the whole formula of Maizhuniwuxibai and Sarsaparilla Roots, Ground Jasmine Herb, Senna Leaf against three kinds of urinary

tract infection bacteria. A mouse model of acute urinary tract infection by *Escherichia coli* was established to investigate the effects of different doses of Maizhuniwuxibai on the general state and urine bacterial culture of mice, and to evaluate its therapeutic effects on urinary tract infection.

Results:(1) Quality inspection of herbs: 155 batches of herbs were qualified after quality inspection, 2 batches of Hairy Chebula, 2 batches of Chebula failed in appearance of traits, 2 batches of *Dicentralea* failed in ash content, and 1 batch of Eugenol failed in content. (2) A one-way examination was conducted on the decoction of Hairy Chebula, examining the time of decoction, etc., and the content of total saponins as well as three kinds of tannin-like components were determined, as well as the determination of *Escherichia coli* MIC before and after decoction. (3) Summarize the crushing process according to the crushing characteristics of each medicinal flavor in the prescription of Maizhuniwuxibai, formulate the pre-treatment method of its medicinal herbs, and select the crushing of the whole medicinal herbs in 1/6 prescription quantity for 20 min according to the comprehensive consideration of the rate of powder output and fluidity; then compare the RSD values of the content of aniline and ellagic acid in the powder under different mixing times, and find that it is optimal to mix it for 10 times. The optimal process for the material reference sample was determined and the quality standard of the material reference sample was established.(4) Pharmacodynamic results: Maizhuniwuxibai has obvious bacteriostatic effect on three common urogenital bacteria, and Maizhuniwuxibai in the middle and high dose groups of UTI animal model has certain therapeutic effect on urinary tract infection in mice.

Conclusion:Herbs of Maizhuniwuxibai grouping were qualified; the total saponin content of Maohuaxia decreased and the medicinal components increased after the decoction. The decoction process, material benchmark sample research, and validation were stabilized; Maizhuniwuxibai has obvious antibacterial effect and significant efficacy against UTI urinary tract infection. It can provide the basis for the subsequent development research of Maizhuniwuxibai.

Key words:Classical formula; urinary tract infection; process; quality standards.

目录

摘要	I
Abstract	II
目录	IV
中英文对照表	VIII
引言	1
第 1 章 文献综述	2
1.1 经典名方研究现状	2
1.1.1 国家政策大力促进中药古代经典名方	2
1.1.2 物质基准研究是桥接传统制法和现代工艺的“对照物质”	3
1.1.3 国内经典名方研究现状	3
1.1.4 日本汉方与中药经典名方研究差异	3
1.2 尿路感染现状分析	5
1.3 尿路感染发病机制及中西医治疗特点	5
第 2 章 买朱尼吾西拜组方药材质量研究及提升	6
2.1 实验仪器及材料	6
2.1.1 实验仪器	6
2.1.2 实验试剂	6
2.1.3 对照品	6
2.1.4 药材	7
2.2 实验方法	7
2.2.1 性状	7
2.2.2 显微鉴别	8
2.2.3 薄层	8
2.2.4 杂质	8
2.2.5 水分	8
2.2.6 灰分	8
2.2.7 酸不溶性灰分	8
2.2.8 浸出物	8
2.2.9 含量测定	9
2.2.10 质量提升	9
2.3 实验结果	11

2.3.1 性状及显微鉴别	11
2.3.2 薄层	16
2.4 讨论	29
2.4.1 性状	29
2.4.2 薄层	29
2.4.3 含量测定	29
第 3 章 毛诃子炮制及质量标准研究	30
3.1 实验仪器及材料	30
3.1.1 实验仪器	30
3.1.2 实验试剂	30
3.1.3 对照品	30
3.1.4 药材	30
3.2 实验方法	31
3.2.1 色度测定	31
3.2.2 总皂苷含量测定	31
3.2.3 没食子酸、安石榴苷和鞣花酸含量测定方法	32
3.2.4 毛诃子炮制品质量标准研究	32
3.3 实验结果	33
3.3.1 色度值测定	33
3.3.2 总皂苷含量测定	34
3.3.3 没食子酸、安石榴苷和鞣花酸含量测定	36
3.3.4 毛诃子及其炮制品的 MIC 值测定	39
3.3.5 毛诃子药材炮制品质量标准建立	39
3.4 讨论	40
第 4 章 买朱尼吾西拜物质基准样品研究	42
4.1 实验仪器及材料	42
4.1.1 仪器	42
4.1.2 试剂	42
4.1.3 对照品	42
4.1.4 药材	42
4.2 实验方法	42
4.2.1 粉碎工具考察	42
4.2.2 投料体积考察	43
4.2.3 出粉率测定	43

4.2.4 休止角的测定及综合评分.....	43
4.2.5 单独粉碎考察.....	43
4.2.6 混合粉碎考察.....	44
4.2.7 粉碎工艺验证.....	44
4.2.8 混合工艺研究.....	44
4.2.9 混合工具确认.....	44
4.2.10 混合次数考察.....	45
4.2.11 混合工艺含量测定.....	45
4.2.12 混合工艺工艺验证.....	45
4.3 实验结果.....	46
4.3.1 粉碎工具考察.....	46
4.3.2 投料体积考察.....	46
4.3.3 单独粉碎考察.....	47
4.3.4 混合粉碎考察.....	49
4.3.5 粉碎工艺验证.....	50
4.3.6 混合工艺结果.....	51
4.3.7 混合工艺验证.....	51
4.3.8 物质基准样品含量测定.....	52
4.4 讨论.....	52
第 5 章 买朱尼吾西拜药效学研究.....	53
5.1 实验仪器及材料.....	53
5.1.1 实验动物.....	53
5.1.2 实验细菌.....	53
5.1.3 实验仪器.....	53
5.1.4 实验试剂.....	54
5.2 实验方法.....	54
5.2.1 体外抑菌实验方法.....	54
5.2.2 尿路感染 UTI 模型方法.....	55
5.3 实验结果.....	57
5.3.1 体外抑菌 MIC 值及 MBC 值的测定.....	57
5.3.2 尿路感染 UTI 模型实验结果.....	58
5.4 讨论与分析.....	61
第 6 章 总结.....	63
参考文献.....	64

致谢	67
作者简介.....	69
石河子大学硕士研究生学位论文导师评阅表	70

中英文对照表 (Abbreviation)

英文缩写	英文全称	中文全称
HE	Hematoxylin-Eosin	苏木素-伊红
HPLC	High Performance Liquid Chromatography	高效液相色谱法
MBC	Minimal Bactericidal Concentration	最小杀菌浓度
MIC	Minimal Inhibit Concentration	最小抑菌浓度
RSD	Relative Standard Deviation	相对标准偏差
UTI	Urinary Tract Infection	尿路感染

引言

古代经典名方指的是目前仍广泛应用、疗效确切、具有明显特色与优势的清代及清代以前医籍所记载的方剂。在《古代经典名方目录(第一批)》中,公布了100个汉代至清代古籍医书中的方剂。现今阶段,国家中医药管理局同国家药品监督管理局联合发布了《古代经典名方目录(第二批)》,共包含217首方剂,其中包括买朱尼吾西拜在内的38首维医药方剂。自古代经典名方提出以来,不少科研院所已开展物质基准与现代制剂研究,生产符合国家规定条件的中药古代经典名方制剂。在申请药品批准文号时,可以只提供非临床安全性研究资料。经典名方优势明显,认可度高,同时具有创新性、传承性,经典名方在中医药领域具有重要地位。

尿路感染(urinary tract infection, UTI)是由侵入尿路组织或黏膜的病原体引起的尿路炎症,其中尿路感染病例总数的80%由大肠杆菌引起。目前,急性尿路感染治疗药物以抗生素为主,以杀菌为目的,常用的药物有头孢克洛、头孢克肟、头孢曲松钠、头孢他啶等。但部分患者疗效差且复发率高。中药治疗则以清利湿热为主,达到治愈病症目的。相比于西药,中药具有无耐药性、副作用小等优势。常用的有癃清胶囊、宁泌泰胶囊、三金片、复方三金胶囊等等。然而在新疆地区,中成药除三金片销售情况良好,其余并不太理想,打造出一款治疗尿路感染的中药民族药刻不容缓。

以维药为代表的新疆中药民族药具有完善的医药理论体系。其独特的理论在治疗妇科疾病、皮肤病和消化道等疾病中有显著作用。但由于种种原因,很多维药的经典方剂不被大众所熟知。很多经典方剂至今还应用在维医医院中,具有很高的开发价值。比如来源于经典民族药物古籍《卡拉巴丁·艾再木》的经典名方买朱尼吾西拜,以欧菝葜根、诃子、毛诃子等为主药,具有清除异常脾液质和异常黏液质,治疗尿路炎症之效,疗效显著。

本课题主要研究买朱尼吾西拜的“物质基准”,药材研究方面包括对药材依据标准进行质量检查及提升;毛诃子炮制及10批次质量标准研究;工艺研究包括对药材进行粉碎工艺与混合工艺研究,考察十位药材粉碎特性、单独粉碎、部分粉碎、全药材粉碎出粉率与粉碎时间,不同混合次数对粉末均匀度的影响,确定物质基准样品工艺;药效学研究包括体外抑菌能力检测与尿路感染动物实验,使用试管二倍稀释法进行买朱尼吾西拜全方及欧菝葜根、地锦草、番泻叶的MIC值测定。开展买朱尼吾西拜UTI尿路感染动物实验,进行体重监测,行为学观察,HE染色,综合评价买朱尼吾西拜对尿路感染的抗菌效果。为买朱尼吾西拜临床上市提供依据,以期开发一款具有中药民族药特色的主治尿路感染的经典名方。

第1章 文献综述

1.1 经典名方研究现状

1.1.1 国家政策大力促进中药古代经典名方

《中华人民共和国中医药法》将“经典名方”定义为至今仍广泛应用、疗效确切、具有明显特色与优势的古代中医典籍所记载的方剂。

2018年，国家中医药管理局发布了《古代经典名方目录（第一批）》，该目录包含了来自37部古代医书的100个古代经典方剂，上至汉代张仲景的《伤寒论》，下至清代祁坤的《外科大成》，包括汤剂、散剂、膏剂、煮散等多个剂型。这是首批古代经典名方目录。经过漫长时间的检验后，已被证实疗效确切。并且长久以来为人们所使用，临床研究数据较多并各具特色，得到广大医学专家及患者所认可^[1]。最引人瞩目的莫过于其再次说明了经典名方免于进行临床试验，在申请药品批准文号时，可以仅提供非临床安全性研究资料，大大缩短了时间，节约成本，这无疑给有志于开发经典名方的药企注入一针强心剂。

2019年，在国家药品监督管理局发布的《古代经典名方中药复方制剂及其物质基准申报资料要求（征求意见稿）》中，旨在鼓励使用优质药材、建立药材追溯体系、鼓励饮片均化投料、科学开展化学成分研究等^[2,3]。以此进行物质基准研究。

2020年，药监局发布了《国家药监局关于促进中药传承创新发展的实施意见》要求：“以临床价值为导向，明确古代经典名方中药复方制剂研制有关技术要求，促进古代经典名方中药复方制剂研发，推进古代经典名方向新药转化。”本课题的选择符合其发展目标及政策导向^[4]。

经典名方的开发主要有以下优势：

（1）政策利好，法律法规逐渐完善；《按古代经典名方目录管理的中药复方制剂药学研究技术指导原则（试行）》、《关于印发中药注册管理补充规定的通知》、《中华人民共和国中医药法》的颁布、《对“古代经典名方目录制定的遴选范围和遴选原则”征求意见的通知》等，都在不断释放国家要大力扶持中医产业发展的信号，其中经典名方成为中医药崛起的重要起点之一^[5]。

（2）西医弊端显现，人们对中医药的认知度不断提升。

（3）经典名方数量众多，不乏成功开发经验。

（4）国家重大新药专项瞄准中药经典名方开发。

从政策、市场、技术、产品认可度等方面综合来看，国家大力扶持中药发展，我国经典名方开发前景广阔。

1.1.2 物质基准研究是桥接传统制法和现代工艺的“对照物质”

经典名方在我国有着悠久、丰富的人用经验。在借鉴日本汉方药管理经验的基础上，综合多方因素，将“标准制剂”“原方制剂”“标准煎液”等统一表述为“物质基准”。“经典名方物质基准”作为经典名方制剂药用物质确定基准^[6]，是衡量制剂与中医临床所使用的药用物质是否一致的标准。是桥接经典名方传统制法与现代制剂工艺的对照物质，是二者间基本一致性评价的标杆。“对经典名方物质基准的表征内容应包括定性鉴别、多成分定量分析、指标成分转移率、出膏率、指纹图谱等指标^[7]。并且经典名方制剂的质量控制指标应与其申报的物质基准指标基本一致^[8]。

1.1.3 国内经典名方研究现状

在 2021 年，国家药品监督管理局（NMPA）累计批准 12 款中药新药上市，超过 2017-2020 年批准新药的总和。获批的 3 款经典名方数占到了中药新药获批总数的 1/4，经典名方的研发前景广阔。同样，近 5 年研究经典名方的趋势增长显著，2021 年共 137 篇文献，而 2022 年共 225 篇文献，2023 年目前共有 326 篇文献。其主要涉及本草考证、指纹图谱、炮制方法、中药复方制剂、化学成分、注册审批、质量控制、物质基准等关键词的研究；大部分项目由国家自然科学基金、国家科技重大专项、国家重点研发计划等基金资助。经典名方也应用于新冠病毒中，在国家卫生健康委办公厅与中医药管理局发布的《新型冠状病毒肺炎诊疗方案》试行版中，其处方组成中大多数中药来自于经典名方或是基于经典名方的化裁。经典名方的应用显著改善了患者的异常指标和临床症状，减少患者不良反应，起到了积极的治疗作用^[9,10]。

1.1.4 日本汉方与中药经典名方研究差异

日本汉方医学起源于中医学，并在长期的发展过程中结合自身的理论研究和临床实践，形成了与中医同源异流的“日本化的中国医学”^[11]。

近年来，日本参照我国《伤寒杂病论》等经典著作，不断完善汉方制剂的注册审批制度，健全汉方制剂的质量管理标准体系，形成了“日本化”的汉方体系。对我国经典名方制剂以及中药新药研究具有一定的借鉴和启示意义^[12,13]。

1.1.4.1 辨证体系差异

日本汉方医学注重辨证治疗，强调实证。以六经及八纲辨证结合的模式，将气血水学说作为核心理论，解证析方，分析方义。而中医研究方证则是强调在处方的基础上探求方剂相对应的病机，存在“一证多方”与“一方多证”^[14]。

1.1.4.2 诊疗方式差异

日本汉方重视腹诊，中医注重脉诊。日本汉方重视腹诊，认为一切疾病的根源在腹部，以腹部为中心确定方证，无论何疾必察腹部^[15]。而中医讲究“望、闻、问、切”四诊，尤其重视脉诊。《黄帝内经》即言“察色按脉，先别阴阳”。

1.1.4.3 常用剂型差异

日本汉方制剂剂型有散剂、丸剂、颗粒剂等，其中以颗粒剂最为常见，约占 90%，颗粒剂作为传统汤剂的改良剂型，继承了汤剂易吸收、显效快的优势，并且有着精细的生产工艺与严格的质量控制。具备了成药易保存、易携带和便于服用的特点^[16]。

中国经方剂型大多为汤剂，较少使用散剂、丸剂等其他剂型^[17]。大多中成药都是现代研发的一些医生经验方，方剂质量良莠不齐。还存在着疗效不确切的情况。因此，作为中医药发源国，发展以经典名方为指导的中医药事业刻不容缓^[18]。

1.1.5 维药经典名方研究

在中医药发展史中，新疆维吾尔药具备完善的医学理论体系和典籍。曾经为西域各族人民的诊治做出过重要贡献。其受到中医药学的影响并结合阿拉伯、印度等民族医药，最终成为了中国民族药的一个独立分支。维吾尔药不仅论述了药物的药性理论、用药法则、炮制和制剂方法、主治病症、临床功效外，还包括药物的来源、产地、栽培、采集以及品质、真伪鉴别等生产方面的知识^[19]。形成了完整的、独特的理论体系。并且创立了一套诊治疾病的学说。比如四大物质学说、体液学说等。

随着现代科学技术进步以及研究技术的不断更新和改进，祖卡木冲剂、阿纳尔糖浆、白孜软膏等维药经典名方已取得了生产批准文号。《维吾尔药品部颁标准》的颁布和实施也大大地促进维吾尔医药经典名方的发展^[20]。

维吾尔药经典名方的发展为新疆各族人民群众的生命健康和当地卫生事业提供一定保障，是提高维吾尔药文化的迫切需要，是弘扬中华民族传统文化的壮举，也是时代赋予我们的历史任务。

1.2 尿路感染现状分析

尿路感染（urinary tract infection, UTI）是由病原体侵入尿路粘膜或组织引起的尿路炎症，是最常见的细菌感染性疾病之一^[21]，全球年发病高达1.5亿例。尿路感染多为大肠埃希菌引起，主要临床症状为尿频、尿急、尿痛、排尿灼热。如果治疗不及时，可导致复杂泌尿系感染，严重影响患者的生活质量^[22]。尿路感染治疗药物多以抗生素为主，却对部分患者疗效差、复发率高。有研究表明，我国约有12.2%的糖尿病患者患有尿路感染，由于女性尿道较短，尿道口临近阴道及肛门，细菌易聚集，女性尿路感染发病率比男性的患病率更高，尿路感染占院内感染类疾病的9.39%-50%^[23]，在南方地区的复杂性尿路感染患者中，中位住院时间为11天，出院后1、3个月再次发生尿路感染的住院率分别为33.97%和56.73%。目前并没有全国范围内的尿路感染流行病学数据，但各地区相关流行病学调研结果表明对尿路感染的防治治疗刻不容缓。

1.3 尿路感染发病机制及中西医治疗特点

早在《内经》中就有对尿路炎症的记载，称为“淋病”。《诸病源候论》记载“诸淋者，由肾虚而膀胱热故也”，证明淋证是一种虚实结合的疾病，“湿热”是淋证致病的因素，“肾虚”是淋病的内因，中医认为淋病与肾气亏虚有关^[24]，现代医学认为淋病与免疫调节机制紊乱或免疫功能低下有关，患者细胞免疫、体液免疫及泌尿系局部免疫功能低下是本病反复发作的主要因素之一。《金匱要略》中也提出了“淋家不可发汗”这一淋病的治疗禁忌^[25]。

西医治疗尿路炎症，以杀菌为目的，将尿路感染分为两类。一种是淋球菌性尿道炎，淋菌性尿道炎由淋病奈瑟菌感染引起，常累及泌尿、生殖系的黏膜，引发局部炎症的产生，是性传播疾病的一种^[26]。另一种是非淋球菌性尿道炎，是由于其他细菌或者病原微生物感染导致的，比如细菌性尿道炎、真菌性尿道炎、滴虫性尿道炎，或者是支原体、衣原体，葡萄球菌感染，大肠杆菌等微生物感染引起^[27]，此外，尿液中的纤维蛋白样物质、白细胞、红细胞、盐类等与黏附的细菌混合产生菌体粘多糖形成尿路生物膜感染症^[28]。治疗时根据不同的微生物类别及感染情况选择不同的抗生素进行治疗。

与西医治疗尿路炎症不同，中药具有无耐药性、副作用小等优点。治疗时以清利湿热来达到治愈病症的目的，不以完全杀灭细菌作为手段。中药提高机体免疫力，调节尿路的内环境。中药对部分患者的疗效甚至优于抗生素，也可以联合使用来减少抗生素的用量和疗程，两者有相辅相成的作用。

第2章 买朱尼吾西拜组方药材质量研究及提升

中药材质量对中药成方制剂的疗效具有重大意义，其真伪直接关系到中医临床用药的安全性和有效性。然后目前中药材市场存在以次充好，以假充真，形态相似误采误收以及药用部位采集不准确的情况，因此对中药材进行质量控制具有重要意义。

对本处方十味药材按 2020 版《中国药典》和《中华人名共和国卫生部药材质量标准》（维吾尔药分册）进行质量标准检查，内容包括性状、鉴别、检查、含量测定等。同时按照《中国药典》中药质量标准起草说明编写细则对个别药材进行质量标准提升起草说明。

2.1 实验仪器及材料

2.1.1 实验仪器

FA1004 电子分析天平（上海字恒平科学仪器有限公司）、CH-500A 高速多功能粉碎机（永康市辰禾盛丰工贸有限公司）、KQ2500DE 型数据超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司）、WFH-203B 暗箱式三用紫外分析仪（上海米青科实业有限公司），CS101-3ABN 电热鼓风干燥箱（重庆市永生实验仪器厂）、FP-40 马弗炉（北京市永光明医疗仪器有限公司）、LC-20AD 高效液相色谱仪（日本岛津）等。

2.1.2 实验试剂

色谱甲醇（S62104ME02H，厂家 SIMARK）、色谱乙腈（CAS 75-05-8，厂家：Fisher）、色谱磷酸（天津市福晨化学试剂厂）、硅胶 G 薄层板（规格：100×100 mm，青岛海洋化工厂分厂），其余试剂甲醇、乙酸乙酯、甲酸、乙醇等均为分析纯。

2.1.3 对照品

诃子对照药材（批号 121289-201804，中国食品药品检定研究院）、毛诃子对照药材（批号 121206-201302，中国食品药品检定研究院）、番泻叶对照药材（批号 121289-201804，中国食品药品检定研究院）、诃黎勒酸（批号:PS011230，纯度 98.6%，成都普思生物科技股份有限公司）。鞣花酸（批号:111959-201903，纯度 88.8%，中国食品药品检定研究院）、没食子酸（批号 110831-201906，中国食品药品检定研究院）、槲皮素（批号 111959-201903，纯度 99.1%，中国食品药品检定研究院）、安石榴苷（批号：

PS103159, 纯度 98.6%, 成都普思生物科技股份有限公司)、金丝桃苷 (批号:PS011230, 纯度 98.6%, 中国食品药品检定研究院)、 β -谷甾醇 (批号:G-002-171216, 纯度 98.6%, 成都普思生物科技股份有限公司)。

2.1.4 药材

收集到的组方药材共有 162 批次, 详细信息如表 2-1。

表 2-1 买朱尼吾西拜组方药材信息表

Table 1 Information of Maizhuniwuxibai prescription

药材名称	药用部位	批次	产地	现有执行标准
菟丝草	地上全草	15	新疆、广西南宁	《卫生部药品标准维药分册》91 页
水龙骨	根	15	成都、新疆、江西九江 四川、云南丽江、云南楚	《卫生部药品标准维药分册》12 页
余甘子	果实	20	雄、海南、广西贵港、云南 临沧	《中国药典 2020 版》
西青果	果实	21	广东、广西、广西玉林、云 南、贵州、印度	《中国药典 2020 版》
欧菝葜根	根	15	安徽、广西、新疆喀什	《卫生部药品标准维药分册》58 页
诃子	果实	16	云南、云南瑞丽、广东广 州、云南保山、广西玉林	《中国药典 2020 版》
毛诃子	果实	15	云南保山、广东广州、云南 玉溪	《中国药典 2020 版》
地锦草	地上全草	15	四川、河南、亳州、永城、 驻马店、铁岭、徐州、河北	《中国药典 2020 版》
盒果藤根	根	15	安徽	《新疆维吾尔自治区维吾尔药材标准》
番泻叶	叶片	15	广东、广西玉林、广西西 林、广西凭祥、云南曲靖、 海南琼海	《中国药典 2020 版》

2.2 实验方法

2.2.1 性状

参照 2020 年版《中国药典》及《卫生部药品标准维药分册》等对药材的形状、颜色、气味、大小、质地、断面等特征进行描述，以区分药材真伪优劣。

2.2.2 显微鉴别

参照 2020 年版《中国药典》等标准对药材粉末进行显微鉴别。

2.2.3 薄层

参照 2020 年版《中国药典》，按各品种项下规定的方法，制备供试品溶液和对照标准溶液，在同一薄层板上点样、展开与检视，供试品色谱图中所显斑点的位置和颜色（或荧光）应与标准物质色谱图的斑点一致。

2.2.4 杂质

《中国药典》2020 版及《卫生部药品标准维药分册》等规定地锦草不得过 3%、番泻叶不得过 6%。检查方法按 2020 年版《中国药典》四部通则 2301 杂质检查法试验。

2.2.5 水分

《中国药典》2020 版及《卫生部药品标准维药分册》等规定番泻叶水分不得过 10.0%、地锦草水分不得过 10.0%、诃子水分不得过 13.0%、毛诃子水分不得过 12.0%，欧菝葜根无水分规定项现进行提升，检查方法按 2020 年版《中国药典》四部通则 0832 水分测定法第二法。

2.2.6 灰分

《中国药典》2020 版及《卫生部药品标准维药分册》等规定盒果藤根不得过 6.0%、地锦草不得过 12.0%、诃子不得过 5.0%、毛诃子不得过 5.0%，检查方法按 2020 年版《中国药典》四部通则 2302 灰分测定法项下总灰分测定法测定。

2.2.7 酸不溶性灰分

《中国药典》2020 版及《卫生部药品标准维药分册》等规定地锦草不得过 3.0%、对无要求的药材进行质量提升，检查方法按 2020 年版《中国药典》四部通则 2302 中酸不溶性灰分测定法测定。

2.2.8 浸出物

《中国药典》2020版要求浸出物地锦草（75%热浸法）不得少于18.0%、诃子不得少于30.0%、毛诃子不得少于20.0%，对无要求浸出物测定的药材进行质量提升。检查方法按2020年版《中国药典》四部通则2201中水溶性浸出物测定法项下的冷浸法及热浸法测定。

2.2.9 含量测定

《中国药典》2020版中收录余甘子没食子酸，地锦草槲皮素，番泻叶番泻苷的含量测定方法。

2.2.9.1 地锦草槲皮素含量测定

《中国药典》2020版规定地锦草按干燥品计算，含槲皮素（ $C_{15}H_{10}O_7$ ）不得少于0.10%。检查方法药典规定方法测定。

2.2.9.2 番泻叶番泻苷含量测定

《中国药典》2020版规定按干燥品计算，含番泻苷A（ $C_{42}H_{38}O_{20}$ ）和番泻苷B（ $C_{42}H_{38}O_{20}$ ）的总量不得少于1.1%。

2.2.10 质量提升

参考《按古代经典名方目录管理的中药复方制剂药学研究技术指导原则》，按照十批次药材提升项的平均值制定标准，杂质、水分、灰分、酸不溶性灰分应低于平均值的120%，浸出物、含量测定应高于平均值的80%。

2.2.10.1 薄层

余甘子、西青果、诃子、毛诃子、番泻叶均有药典薄层鉴别标准，按其药典中规定方法进行鉴别，除药典规定外，对药材特征性成分进行质量提升，余甘子（没食子酸，绿原酸）、西青果（金丝桃苷，槲皮素）、菟丝草（金丝桃苷，咖啡酸）、水龙骨（山奈素， β -谷甾醇），薄层分析方法如下：

（1）供试品溶液配制：取过三号筛的药材粉末0.1g，加入3mL甲醇后，静置30min，超声30min（180W），过滤即得。

（2）对照品配制：分别称取没食子酸、绿原酸、金丝桃苷、槲皮素、 β -谷甾醇、咖啡酸、山奈素对照品适量，加适量甲醇，超声30min，过滤得浓度分别为99 $\mu\text{g/mL}$ 、175 $\mu\text{g/mL}$ 、111 $\mu\text{g/mL}$ 、124 $\mu\text{g/mL}$ 、149 $\mu\text{g/mL}$ 、105 $\mu\text{g/mL}$ 、132 $\mu\text{g/mL}$ 、127 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品溶液。

（3）鉴别方法：照薄层色谱法（通则0502）试验，精密吸取供试品溶液4 μL 和

对照品溶液溶液 3 μ L, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 每批次药材单独点板, 没食子酸展开剂为环己烷: 乙酸乙酯: 甲酸 (6: 5: 1), 显色剂为 1%三氧化铁溶液, 于日光下检视, 对照品与样品在同一位置显相同的蓝色清晰斑点: 绿原酸展开剂为乙酸乙酯: 甲酸-水 (14: 1: 1), 显色剂为 10%硫酸乙醇, 紫外检视波长 365 nm, 对照品与样品在相同水平位置显蓝色斑点: 金丝桃苷展开剂为三氧甲烷: 甲醇: 冰乙酸: 水 (12: 4: 3: 1), 显色剂为 1%硫酸乙醇, 紫外检视波长 365 nm, 可见黄绿色清晰光斑: 槲皮素展开剂为环己烷: 乙酸乙酯: 甲酸 (5: 10: 1), 显色剂为 1%三氯化铝溶液, 紫外检视波长 365 nm, 对照品和样品应显同样蓝色荧光点: β -谷甾醇展开剂为三氯甲烷-乙酸乙酯-甲醇 (12: 5: 2), 显色剂为 10%硫酸乙醇, 紫外检视波长 365 nm, 对照品与样品在相同位置显相同紫色清晰光斑: 咖啡酸展开剂为环己烷-乙酸乙酯-甲酸 (3: 3: 1), 紫外检视波长 365 nm, 对照品与样品在同一水平位置显蓝色光斑: 山奈素展开剂为环己烷-乙酸乙酯-甲酸 (6: 5: 1), 显色剂为 1%三氯化铝, 紫外检视波长 365 nm, 对照品与样品在同一水平位置显相同荧光光斑。

2.2.10.2 含量测定

对诃子、毛诃子、欧菝葜根、盒果藤根进行质量提升。毛诃子提升项为没食子酸、安石榴苷、鞣花酸的含量测定, 诃子提升成分为诃黎勒酸、鞣花酸的含量测定。欧菝葜根提升成分为水分、灰分等。盒果藤根提升成分为水分。

2.2.10.2.1 诃子诃黎勒酸、鞣花酸含量测定

(1) 溶液制备: 取诃子粉末 (过三号筛) 约 0.1 g, 置 100 mL 容量瓶中, 精密加入 100%甲醇溶液定容, 超声 30 min 后, 取上清液过 0.22 μ m 滤膜, 即得。精密称取诃黎勒酸对照品适量, 用纯甲醇溶解定容至 50 mL 容量瓶, 即得浓度约为 398.70 μ g/mL 的对照品储备液。取鞣花酸对照品适量, 用纯甲醇溶解定容至 50 mL 容量瓶, 即得浓度约为 193.41 μ g/mL 的对照品储备液。

(2) 色谱条件: 色谱柱 (SpursilC18, 250 $\times$ 4.6 mm, 5 μ m), 流动相: 甲醇 (A) -0.1%磷酸 (B); 流速 1.0 mL/min, 检测波长为 258 nm, 柱温 35 $^{\circ}$ C, 进样量 5 μ L。洗脱程序: 0-10 min, 5%-15%A; 10-26 min, 15%-30%A; 26-36 min, 30%-50%A; 36-45 min, 50%-83%A; 45-50 min, 83%-50%A; 50-60 min, 50%-5%A。

(3) 线性关系考察: 将已配制好的诃黎勒酸、鞣花酸、稀释成 6 个不同浓度的溶液, 精密吸取对照品溶液 10 μ L 进样测定。以进样分析浓度 X 为横坐标, 峰面积 Y 为纵坐标, 绘制标准曲线。

(4) 精密度试验: 精密吸取诃黎勒酸浓度 100.56 μ g/mL, 鞣花酸浓度 40.18 μ g/mL 的混合对照品溶液 10 μ L, 连续进样测定 6 次, 记录峰面积, 计算峰面积的 RSD 值。

(5) 重复性试验: 精密称取 6 份诃子制成供试品溶液, 分别进样 5 μL , 记录峰面积, 计算诃黎勒酸与鞣花酸含量及 RSD 值。

(6) 稳定性试验: 取同一份供试品溶液, 分别在 0、2、4、6、8、10、12h 内耳取 10 μL 进样测定, 记录峰面积, 计算峰面积的 RSD 值。

(7) 加样回收率试验: 取已知含量的诃子溶液, 平行制样 6 份, 按色谱条件进样测定, 记录峰面积并计算加样回收率及回收率的 RSD 值。

2.2.10.2.2 毛诃子没食子酸, 安石榴苷和鞣花酸含量测定

(1) 溶液制备: 称取没食子酸, 安石榴苷和鞣花酸对照品适量, 精密称定, 分别加甲醇制成质量浓度依次为 71.8321, 256.7185, 98.3549 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液。称取毛诃子粉末 0.1 g 过三号筛, 置 25 mL 容量瓶中, 精密加入 50% 甲醇定容至刻度线, 超声 20 min 后, 取上清液过 0.22 μm 滤膜, 即得。

(2) 色谱条件: 色谱柱为 Agilent C18 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm) ; 流动相: 乙腈 (A) -0.1% 磷酸 (B) , 梯度洗脱 (0~20 min, 5%~12% A; 20~45 min, 12%~30% A; 45~50 min, 30%~5% A; 50~55 min, 5% A); 流速: 0.9 mL $\cdot\text{min}^{-1}$; 检测波长: 360 nm; 柱温: 35 $^{\circ}\text{C}$; 进样量: 20 μL 。

(3) 线性关系观察: 将已配制好的安石榴苷、鞣花酸、稀释成 6 个不同浓度的溶液, 以对照品测得的峰面积值为纵坐标绘制标准曲线。

(4) 精密度试验: 精密吸取混合对照品溶液 20 μL , 连续进样测定 6 次, 记录峰面积, 计算峰面积的 RSD 值。

(5) 重复性试验: 精密称取同一供试品溶液 6 份, 分别进样 20 μL , 记录峰面积, 计算各成分含量并计算 RSD 值。

(6) 稳定性试验: 取同一份供试品溶液, 分别在 0、2、4、6、8、10、12 h 内取 20 μL 进样测定, 记录峰面积, 计算峰面积的 RSD 值。

(7) 加样回收率试验: 取已知含量的诃子溶液, 平行制样 6 份, 按色谱条件进样测定, 记录峰面积并计算加样回收率及回收率的 RSD 值。

2.3 实验结果

2.3.1 性状及显微鉴别

2.3.1.1 欧菝葜根

本品为百合科植物马兜铃叶菝葜 *Smilax aristolochiaefolia* Miller. 的干燥根。秋季采挖, 洗净, 晒干或扎成束, 晒干。呈细长圆柱形, 直径 3-5 mm, 多弯曲并扎成长 30-50

cm 的小束，表面黄棕色至棕红色，具纵沟壑，根状茎粗短，不规则，地上茎节布膨大，淡黄棕色，有纵条纹，质略脆，易折断，断面皮部浅黄色，木质部色略深，并具多数细孔，髓部白色，木部与皮部易分离，粉性，微有粘滑感。气微，味辛淡。



图 2-1 4 批次欧菝葜根药材性状

Figure 2-1 Four batches of Sarsaparilla root herb traits

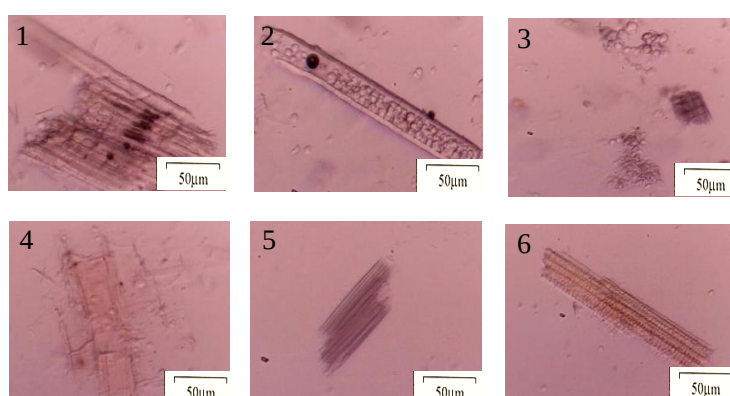


图 2-2 欧菝葜根粉末显微鉴别

Figure 2-2 Microscopic Identification of Sarsaparilla Root Powder

注：1.纤维；2.厚壁细胞；3.淀粉粒；4.薄壁细胞；5.针晶；6.导管

Notes: 1. fibers; 2. thick-walled cells; 3. starch granules; 4. thin-walled cells; 5. needle crystals; 6. Ducts

2.3.1.2 盒果藤根

本品为旋花科植物盒果藤 *Operculin turpethurm* (L) S.Manso 的干燥根。本品类圆柱形的根或根皮，表皮棕色或棕褐色，皮部白色略呈粉性，木部黄白色质坚。气微，味苦。



图 2-3 5 批次盒果藤根药材性状

Figure 2-3 Five batches of box elder root herb traits

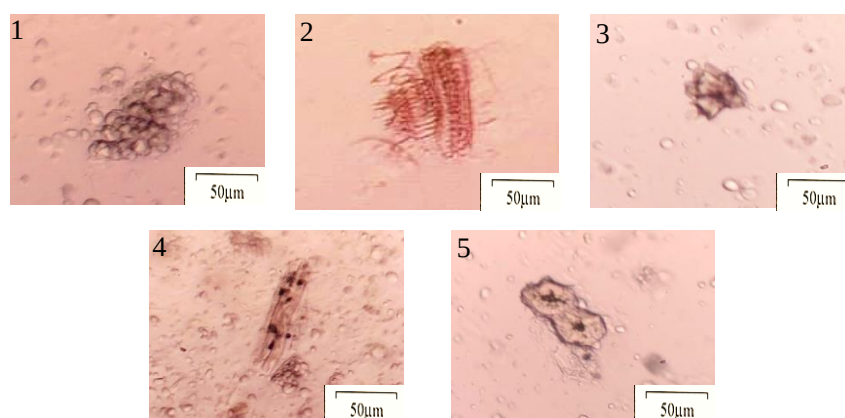


图 2-4 盒果藤根粉末显微鉴别

Figure 2-4 Microscopic Identification of the Root Powder of Boxglove Vine

注：1.淀粉粒；2.厚壁细胞；3.簇晶；4.纤维；5.石细胞

Note: 1. starch granules; 2. thick-walled cells; 3. cluster crystals; 4. fibers; 5. stone cells

2.3.1.3 番泻叶

本品为豆科植物狭叶番泻 *Cassia angustifolia* Vahl 或尖叶番泻 *Cassia acutifolia* Delile 的干燥小叶。呈长卵形或卵状披针形，上表面黄绿色，下表面浅黄绿色。

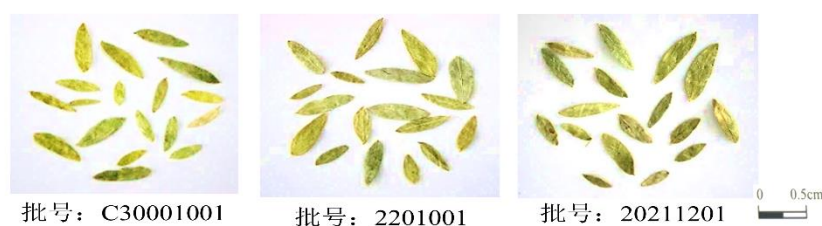


图 2-5 3 批番泻叶药材性状

Figure 2-5 Three batches of senna herb traits

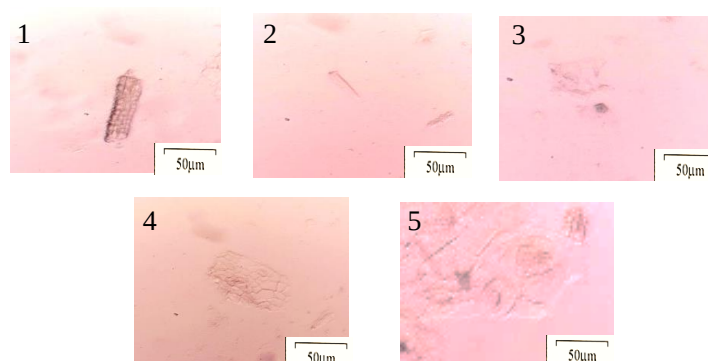


图 2-6 番泻叶粉末显微鉴别

Figure 2-6 Microidentification of Senna Leaf Powder

注：1.纤维；2.非腺毛；3.簇晶；4.薄壁细胞；5.气孔

Notes: 1. fibers; 2. non-glandular hairs; 3. tufted crystals; 4. thin-walled cells; 5. stomata

2.3.1.4 地锦草

本品为大戟科植物地锦 *Euphorbia humifusa* Willd.或斑地锦 *Euphorbia maculata* L.的干燥全草。夏、秋二季采收，除去杂质，晒干。常皱缩卷曲，根细小。茎细，呈叉状分枝。质脆，易折断，断面黄白色，中空。单叶对生，具淡红色短柄或几无柄；叶片多皱缩或已脱落，展平后呈长椭圆形，种子细小，卵形，褐色。气微，味微涩。

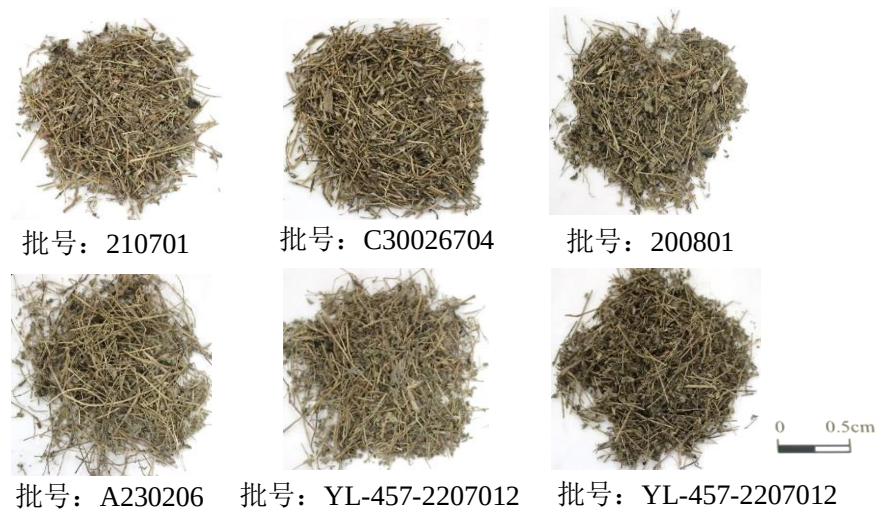


图 2-8 6 批次地锦草药材性状

Figure 2-8 Six batches of Dijinshu Herb Traits

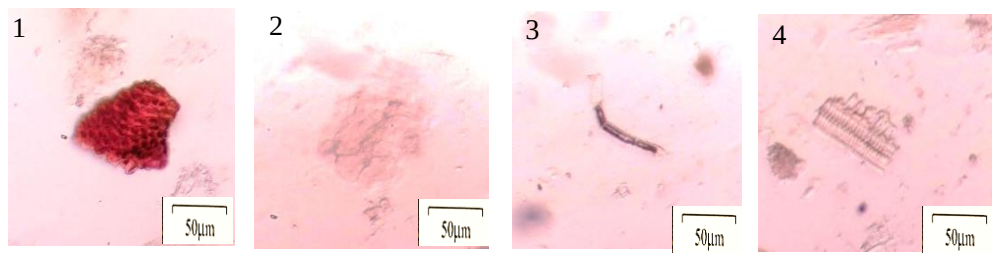


图 2-9 地锦草粉末显微鉴别

Figure 2-1 Microscopic Identification of Ground Clover Powder

注：1.叶表皮细胞；2.叶肉组织；3.非腺毛；4.螺纹导管

Notes: 1. leaf epidermal cells; 2. leaf fleshy tissue; 3. non-glandular hairs; 4. threaded ducts

2.3.1.5 诃子

本品为使君子科植物诃子 *Terminalia chebula* Retz. 或绒毛诃子 *Terminalia chebula* Retz.var.tomentella Kurt. 的干燥成熟果实。本品为长圆形或卵圆形，表面黄棕色或暗棕色，略具光泽，质坚实。果肉黄棕色或黄褐色。种子狭长纺锤形，种皮黄棕色，子叶 2，

白色，相互重叠卷旋。气微，味酸涩后甜。

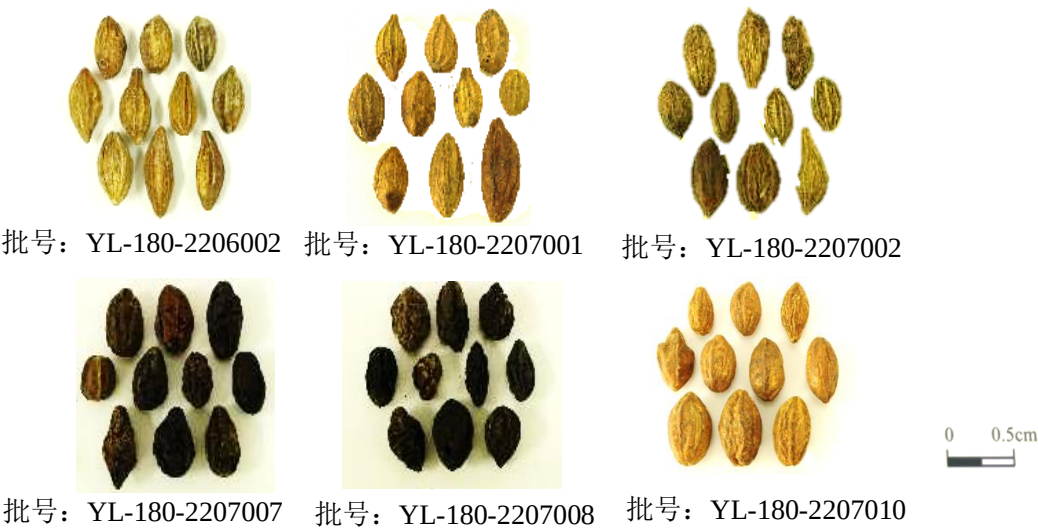


图 2-10 6 批次诃子药材性状

Figure 2-10 Six batches of chebulbulic herbs traits

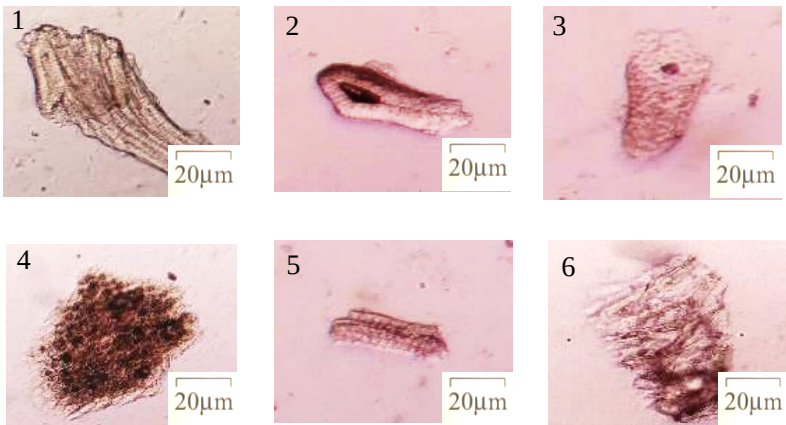


图 2-11 诃子粉末显微鉴别

Figure 2-11 Chebulin Powder Microscopic Identification

注：1.纤维；2.石细胞；3.厚壁细胞；4.表皮细胞；5.导管；6.薄壁细胞

Notes: 1.fibers; 2.stone cells; 3.thick-walled cells; 4.epidermal cells; 5.ducts; 6.thin-walled cells

2.3.1.6 毛诃子

本品系藏族习用药材。为使君子科植物毗黎勒 *Terminalia bellirica* (Gaertn.) Roxb. 的干燥成熟果实。冬季果实成熟时采收，除去杂质，晒干。本品呈卵形或椭圆形，表面棕褐色，被细密绒毛，基部有残留果柄或果柄痕。暗棕色或浅绿黄色，果核淡棕黄

色。种子 1，种皮棕黄色，种仁黄白色，有油性。气微，味涩、苦。



图 2-12 6 批次毛诃子药材性状
Figure 2-12 Six batches of Chebulbulia herb traits

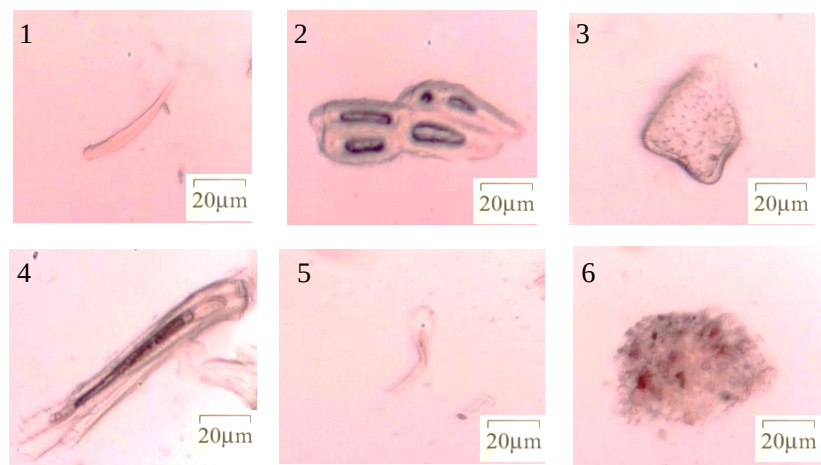


图 2-13 毛诃子粉末显微鉴别
Figure 2-13 Microidentification of Chebulbulia powder
注：1.非腺毛；2.石细胞；3.木化细胞；4.导管；5.纤维； 6.表皮细胞
Notes: 1.non-glandular hairs; 2.stone cells; 3.lignified cells; 4.ducts; 5.fibers; 6.epidermal cells

2.3.2 薄层

药典中记载了番泻叶、地锦草、余甘子、西青果的薄层色谱鉴别方法，与对照品对比后发现，所购进的药材薄层鉴别均符合药典要求；并对药典未要求的药材进行质量提升。薄层鉴别图见 2-14。

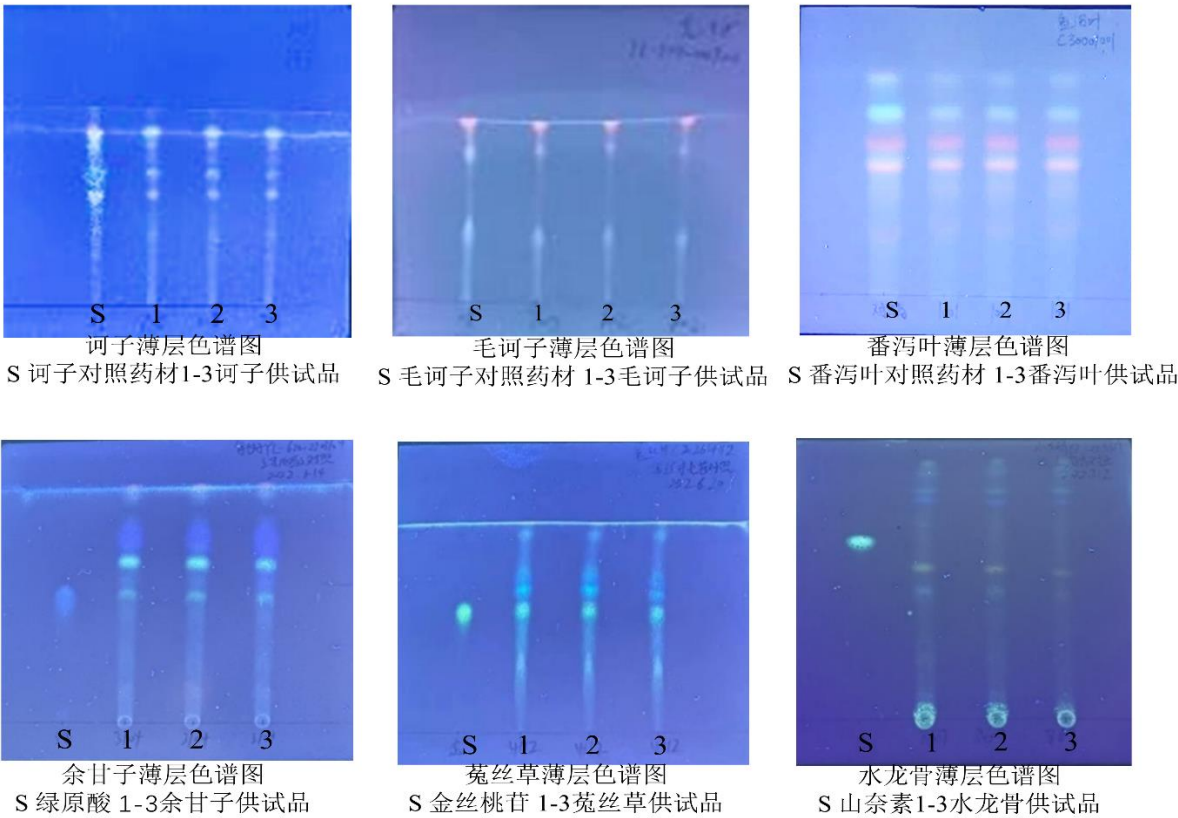


图 2-14 买朱尼吾西拜药材薄层鉴别及质量提升

Figure 2-14 Thin Layer Identification and Quality Enhancement of Buy Juniperusibai Herbs

2.3.3 药材质量检查及质量提升

2.3.3.1 欧菝葜根

欧菝葜根水分在 4.34%~5.39%范围内，现行标准无规定，质量提升标准为低于 5.74%。总灰分在 4.76%~8.47%之间，现行标准无规定，质量提升标准为低于 8.86%。欧菝葜根酸不溶性灰分为 0.16%~0.96%，现行标准无规定，质量提升标准为低于 0.62%。第 4 批欧菝葜根不符合质量提升标准。欧菝葜根浸出物为 15.79%~32.76%，现行标准无规定，质量提升标准为高于 23.14%。结果表明，第 4 批和第 10 批欧菝葜根不符合质量提升标准。见表 2-2。

表 2-2 欧菝葜根药材检查结果

Table 2-2 Sarsaparilla Root Herbal Inspection Results					
药材名称	批号	水分/%	总灰分/%	酸不溶性灰分/%	浸出物/%
欧菝葜根	1	5.39	6.91	0.26	27.53
	2	4.57	8.47	0.48	32.20
	3	4.90	7.89	0.36	31.19
	4	4.34	7.79	0.87	29.30
	5	4.91	7.77	0.61	32.76
	6	4.73	7.45	0.46	32.36
	7	4.62	4.76	0.16	30.40
	8	4.90	7.82	0.41	29.32
	9	4.84	7.25	0.19	28.39
	10	4.66	7.71	0.31	15.79

2.3.3.2 盒果藤根

盒果藤根总灰分在 4.12%~5.82%之间，现行标准规定盒果藤根总灰分不得过 6.0%，均合格。盒果藤根水分在 5.11%~6.25%范围内，现行标准无规定，质量提升标准为低于 6.62%，均符合质量提升标准。见表 2-3。

表 2-3 盒果藤根药材检查结果

Table 2-3 Boxglove Garcinia Cambogia Root Herb Inspection Results			
药材名称	批号	水分/%	总灰分/%
盒果藤根	1	5.44	4.29
	2	5.40	6.31
	3	6.12	4.12
	4	6.25	5.33
	5	5.32	4.54
	6	5.11	4.40
	7	5.26	4.89
	8	5.28	5.05
	9	5.34	5.45
	10	5.56	6.01
	11	5.86	4.26

2.3.3.3 诃子

诃子水分在 4.91%~6.63%范围内，现行标准规定诃子水分不得过 13.0%，均合格；诃子总灰分在 2.45%~4.06%之间，现行药典规定诃子总灰分不得过 5.0%，均合格；诃子浸出物在 42.47%~57.33%间，现行标准规定诃子浸出物不得少于 30.0%，均合格。见表 2-4。

2.3.3.3.1 水分、灰分、浸出物

表 2-4 诃子药材检查结果

Table 2-4 Horehound herb inspection results

药材名称	批号	水分/%	总灰分/%	浸出物/%
诃子	1	6.09	2.45	42.47
	2	6.63	2.89	48.64
	3	6.29	2.74	57.07
	4	6.21	2.48	49.09
	5	6.06	2.55	57.07
	6	4.91	3.84	44.73
	7	5.11	3.87	56.21
	8	5.04	4.06	48.41
	9	5.92	3.02	50.24
	10	5.85	2.66	45.28
	11	6.03	3.04	57.33
	12	5.65	2.62	43.86
	13	5.81	2.86	45.32

2.3.3.3.2 含量测定

(1) 诃黎勒酸及鞣花酸含量测定色谱图如下：

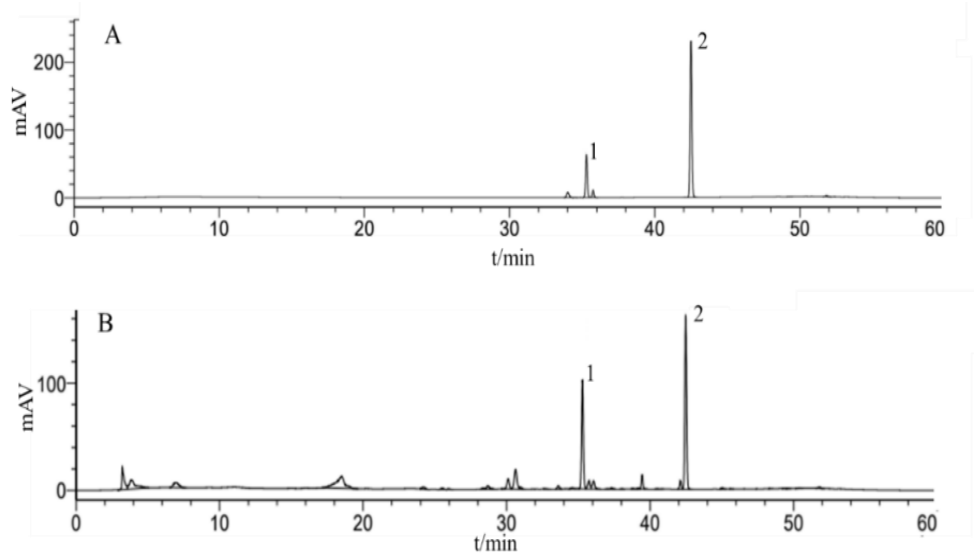


图 2-15 诃子诃黎勒酸和鞣花酸的 HPLC 图

注：A.对照品；B.供试品；1.诃黎勒酸；2.鞣花酸

Figure 2-15 HPLC plots of chebulinic acid and ellagic acid in chebulinic acid

Note: A.Control; B.Test; 1.Chebulinic acid; 2.Ellagic acid

(2) 线性关系考察：以对照品进样分析浓度 X (μg/mL) 为横坐标，峰面积 Y 为纵坐标，绘制标准曲线（图 2-18），得诃黎勒酸，鞣花酸的回归方程分别为 $y=6707.9x-75367$ ($R^2=0.9994$)， $y=51717x-10485$ ($R^2=0.9995$)，结果显示上述两种成分质量浓度分别在 19.80~200.22，7.86~97.34 μg/mL 范围内与各自峰面积成良好的线性关系。

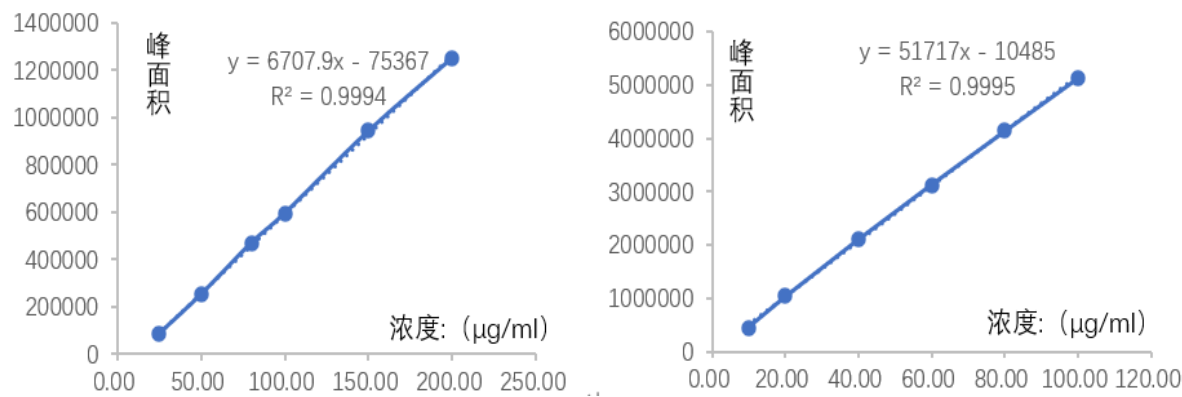


图 2-16 诃黎勒酸（左）鞣花酸（右）标准曲线图

Figure 2-16 Harollicacid (left) ellagic acid (right) chart

(3) 精密度试验：同一浓度的对照品溶液，连续进样测定 6 次，记录峰面积。结果显示，诃黎勒酸，鞣花酸峰面积的 RSD 分别为 0.36%，0.41% (n=6)，表明该方法

精密度良好。

（4）重复性试验：6 份供试品溶液，进样分析，记录峰面积并计算样品含量。结果显示，诃黎勒酸，鞣花酸含量的 RSD 分别为 1.98%、1.12%（n=6），表明该方法重复性良好。

（5）稳定性试验：用同一份供试品溶液，进样分析，结果显示，诃黎勒酸和鞣花酸的峰面积的 RSD 分别为 0.42%，0.56%（n=6），表明供试品溶液在室温下放置 24 h 内稳定性良好。

（6）加样回收率试验：6 份供试品溶液，分别进样测定，采用外标法计算含量，结果见表 2-9，诃黎勒酸回收率为 101.4%，鞣花酸回收率为 100.2%，RSD 值为 0.29%，0.52%。

表 2-5 加样回收率结果

Table 2-5 Sample recovery results

待测成分	称样量/g	已知量/ μg	加入量/ μg	测得量/ μg	加样回收率/%	平均值/%	RSD%
诃黎勒酸	0.1008	69.39	70.04	140.49	101.5	101.4	0.29
	0.1005	69.27	70.04	140.55	101.7		
	0.1012	69.52	70.04	140.41	101.2		
	0.1014	69.64	70.04	140.84	101.6		
	0.1013	69.64	70.04	140.35	101.0		
	0.1008	69.40	70.04	140.44	101.4		
鞣花酸	0.1008	12.25	12.32	24.62	100.4	100.2	0.52
	0.1005	12.17	12.32	24.63	101.1		
	0.1012	12.34	12.32	24.65	99.9		
	0.1014	12.41	12.32	24.70	99.8		
	0.1013	12.40	12.32	24.71	100.0		
	0.1008	12.27	12.32	24.55	99.7		

（7）含量测定结果：见表 2-6。

表 2-6 诃子含量测定结果

Table 2-6 Measurement results of chebulin content

药材名称	批号	诃黎勒酸 mg/g	鞣花酸 mg/g
诃子	1	164.25	33.51
	2	146.58	35.16
	3	151.56	24.63
	4	171.22	41.35
	5	165.36	46.53
	6	176.52	34.88
	7	166.87	22.63
	8	170.23	23.65
	9	143.52	41.10
	10	144.96	38.44

2.3.3.4 地锦草

地锦草杂质在 0.01%~0.79%范围内，现行标准规定。地锦草药材的杂质不得过 3%，均合格；地锦草水分在 6.72%~7.70%范围内，现行标准规定地锦草水分不得过 10.0%，均合格；地锦草总灰分在 10.27%~11.52%之间，现行药典规定地锦草总灰分不得过 12.0%，均合格；地锦草酸不溶性灰分在 1.97%~2.71%间，现行药典规定地锦草总灰分不得过 3.0%，均合格；地锦草浸出物在 18.10%~29.18%间，现行标准规定地锦草浸出物不得少于 18.0%，均合格；槲皮素含量在 0.06%~0.27%之间，现行标准规定地锦草槲皮素含量不得少于 0.10%，两批次地锦草不合格。测定结果见图 2-15 及表 2-5。

表 2-7 地锦草药材检查结果

Table 2-7 Digitonin herb check results

药材名称	批号	杂质 /%	水分 /%	总灰分 /%	酸不溶性	浸出物/%	槲皮素含量 /%
					灰分 /%		
地锦草	1	0.79	7.70	11.19	2.19	29.18	0.2559
	2	0.17	7.46	10.27	2.26	21.84	0.1837
	3	0.09	6.86	11.28	2.44	18.10	0.1309
	4	0.27	7.21	11.48	2.16	18.39	0.1166
	5	0.54	7.21	11.34	2.31	18.89	0.1020
	6	0.45	7.31	11.13	2.59	19.60	0.1813
	7	0.13	7.21	11.51	2.70	19.89	0.1718
	8	0.40	7.21	11.22	2.42	20.17	0.1753
	9	0.24	6.72	11.52	2.71	19.34	0.1283
	10	0.23	7.11	11.46	2.02	19.05	0.1069
	11	0.25	6.72	10.46	1.99	18.65	0.1438
	12	0.14	6.77	11.48	2.33	20.67	0.0758
	13	0.15	7.12	11.48	2.58	18.63	0.0636
	14	0.01	7.42	10.27	1.97	21.28	0.1785
	15	0.25	7.00	10.27	2.26	23.28	0.2728

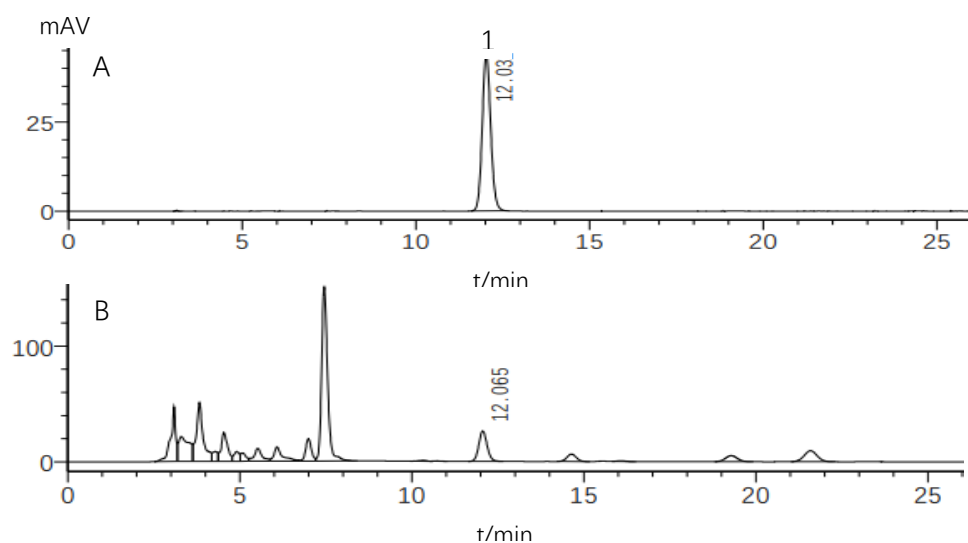


图 2-17 地锦草槲皮素的 HPLC 图

Figure2-17 HPLC graph of quercetin of Digitonin Quercetin

注：A.对照品；B.供试品；1.槲皮素

Note: A. Control; B. Test; 1. Quercetin

2.3.3.5 番泻叶

番泻叶杂质在 0.58%~1.17%范围内，现行标准规定番泻叶药材的杂质不得过 6%，均合格；番泻叶水分在 6.90%~9.25%范围内，现行标准规定番泻叶水分不得过 10.0%，均合格；番泻苷 A 和番泻苷 B 的总量在 1.10%~1.49%范围内，现行标准规定不得少于 1.10%，均合格。测定结果见图 2-18 及表 2-8。

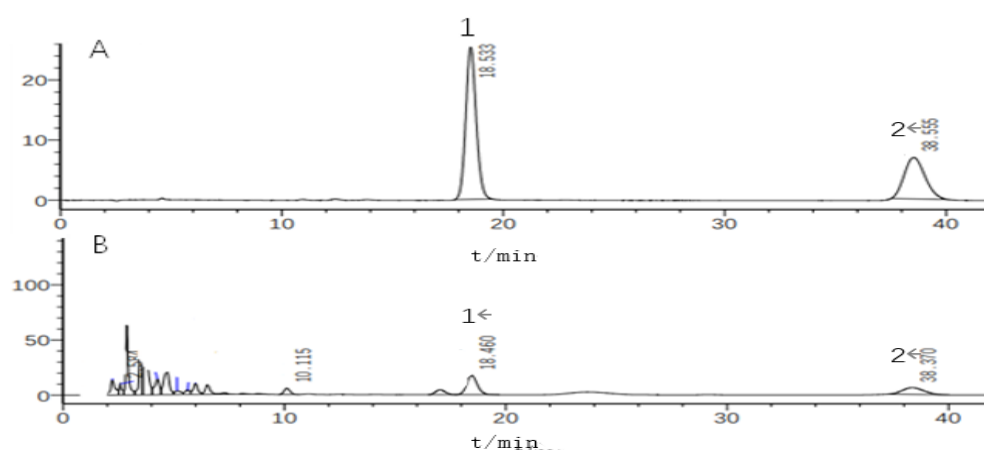


图 2-18 番泻叶番泻苷的 HPLC 图

Figure2-18 HPLC graph of Senna sennosides of Senna leaves

注：A.对照品；B.供试品；1.番泻苷 A；2.番泻苷 B

Note: A. Control; B. Test; 1. Sennaoside A; 2. Sennaoside B

表 2-8 番泻叶药材检查结果

Table 2-8 Senna herb check results

药材名称	批号	杂质/%	水分/%	番泻苷 A 和番泻苷 B 总量 /%
番泻叶	1	0.72	7.87	1.10
	2	0.58	7.68	1.26
	3	0.95	8.08	1.34
	4	1.09	9.25	1.27
	5	0.91	8.33	1.49
	6	0.99	7.17	1.15
	7	1.12	7.03	1.16
	8	1.02	7.07	1.14
	9	1.14	7.28	1.24
	10	1.07	7.30	1.21
	11	1.17	7.16	1.19
	12	0.94	7.03	1.14
	13	0.96	6.97	1.17
	14	0.94	6.90	1.18
	15	1.10	7.02	1.11

2.3.3.6 毛诃子

2.3.3.6.1 水分、灰分、浸出物

经检查，毛诃子水分在 5.27%~6.05%范围内，现行药典规定毛诃子药材水分不得过 12.0%，均合格；毛诃子总灰分在 4.39%~4.92%之间，现行药典规定毛诃子总灰分不得过 5.0%，均合格；毛诃子浸出物在 41.82%~52.60%间，现行标准规定毛诃子浸出物不得少于 20.0%，均合格；见表 2-9。

表 2-9 毛诃子药材检查结果

Table 2-9 Chebulbulia herb check result

药材名称	批号	水分/%	总灰分/%	浸出物/%
毛诃子	1	5.32	4.87	45.18
	2	5.54	4.77	42.24
	3	5.79	4.40	42.08
	4	5.83	4.39	41.82
	5	5.67	4.64	48.21
	6	5.77	4.88	49.93
	7	5.86	4.43	43.86
	8	5.55	4.60	52.60
	9	6.03	4.88	49.93
	10	5.27	4.92	44.55
	11	6.05	4.54	46.25
	12	5.82	4.54	46.25

2.3.3.6.2 毛诃子没食子酸、安石榴苷、鞣花酸含量测定

(1) 含量测定：色谱图结果见图 2-19 。

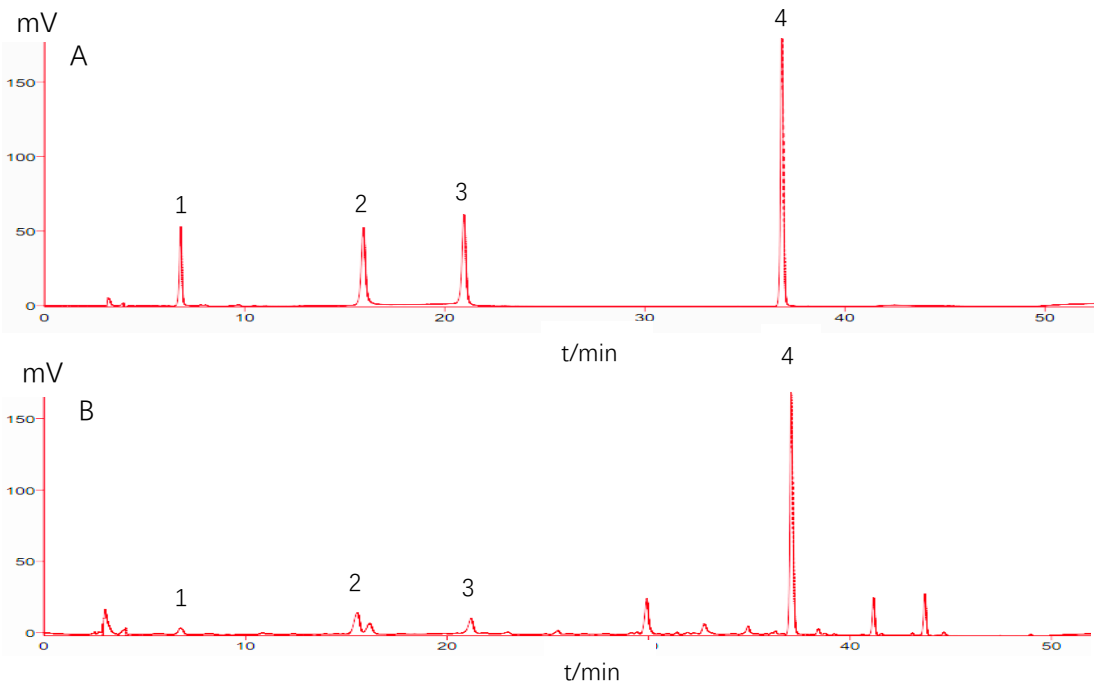


图 2-19 对照品溶液和供试品溶液的 HPLC 图

Figure2-19 HPLC plots of control solution and test solution

Note: A. Control; B. Test; 1. Gallic acid; 2. Andrographidine α;
3. Andrographidine β; 4. Ellagic acidNote:A.reference

(2) 线性关系考察：以对照品进样分析浓度 X (μg/mL) 为横坐标，峰面积 Y 为纵坐标，绘制标准曲线（图 2-8），得没食子酸、安石榴苷 β、鞣花酸的回归方程分别为 $Y=13860X+7577.1$ ($R^2=0.9995$)、 $Y=18332X-7359.5$ ($R^2=0.9998$)、 $Y=20967X-4872.8$ ($R^2=0.9994$)。结果表明，没食子酸、安石榴苷、鞣花酸的进样量分别在 0.0032~0.0420 mg、0.0042~0.0460 mg、0.0065~0.0560 mg 质量范围内与峰面积呈良好的线性关系，符合外标法定量测定的要求。结果见图 2-20。

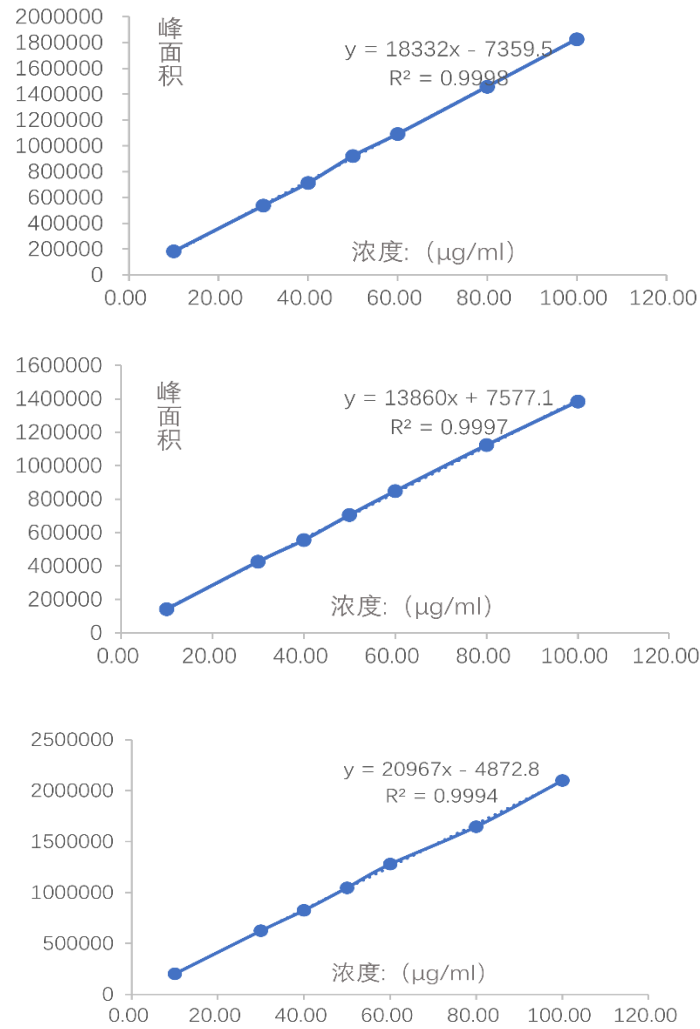


图 2-20 诃黎勒酸（上）、安石榴苷 β（中）、鞣花酸（下）标准曲线图

Figure 2-20 Schematic diagram of chebulinic acid (top), andrographidine β (middle), and ellagic acid (bottom)

(3) 精密度试验：同一浓度的对照品溶液，连续进样 6 次，记录各组色谱峰峰面积。结果没食子酸、安石榴苷 β、鞣花酸的峰面积 RSD 分别为 0.84%、0.98%、0.42%

(n=6)。说明仪器精密度良好。

(4) 重复性试验：6 份供试品溶液，进样分析，记录峰面积并计算样品含量。结果显示，没食子酸、安石榴苷 β、鞣花酸含量的 RSD 分别为 2.05%、1.75%、1.23%。表明该方法重复性良好。

(5) 稳定性试验：用同一份供试品溶液，在样品制备后 0、2、4、8、12、24 h 进样分析，结果显示，没食子酸、安石榴苷 β、鞣花酸 RSD 值分别为 0.31%、0.45%、0.24%（n=6），表明供试品溶液在室温下放置 24 h 内稳定性良好。

(6) 加样回收率试验：6 份供试品溶液，分别进样测定，采用外标法计算含量，结果见表 2-9，没食子酸、安石榴苷 β、鞣花酸的平均加样回收率分别为 100.8%、100.0%、100.8%。RSD 值分别为 0.79%、0.43%、0.83%。结果表明该方法加样回收试验结果良好。结果见表 2-11。

表 2-11 诃黎勒酸和鞣花酸加样回收率试验结果（n=6）

Table 2-8 Results of spiked sample recoveries of chebulic acid and ellagic acid （n=6）

待测成分	称样量/g	已知量/μg	加入量/μg	测得量/μg	加样回收率/%	平均值/%	RSD%
没食子酸	0.1016	8.26	10.12	18.52	101.38	100.8	0.79
	0.1010	8.05	10.12	18.26	100.89		
	0.1012	8.10	10.12	18.38	101.58		
	0.1010	8.04	10.12	18.25	100.89		
	0.1005	7.91	10.12	18.11	100.79		
	0.1008	8.01	10.12	18.06	99.31		
安石榴苷 β	0.1016	4.25	6.06	10.30	99.83	100.0	0.43
	0.1010	4.18	6.06	10.22	99.67		
	0.1012	4.20	6.06	10.28	100.33		
	0.1010	4.18	6.06	10.24	100.00		
	0.1005	4.10	6.06	10.20	100.66		
	0.1016	4.25	6.06	10.30	99.83		
鞣花酸	0.1016	8.48	10.24	18.76	100.39	100.8	0.83
	0.1010	8.26	10.24	18.64	101.37		
	0.1012	8.33	10.24	18.70	101.27		
	0.1010	8.25	10.24	18.66	101.66		
	0.1005	8.12	10.24	18.42	100.59		
	0.1008	8.23	10.24	18.41	99.41		

2.4 讨论

2.4.1 性状

药材性状如外观、颜色、质地、用药部位等会因为产地的不同而略有差异，广东的诃子呈深褐色，其他产地的诃子呈深黄色。比如毛诃子药材重量差异略大，质量较大的有8 g,质量较小的只有3 g。还有番泻叶地锦草的杂质差异等。本实验购买的药材，其中两批地锦草鞣质含量不合格，两批诃子，两批毛诃子为去核果实，不符合处方中全果入药的要求。

2.4.2 薄层

按照《2020版药典》及《卫生部部颁标准》等进行薄层鉴别，其余无标准要求的药材进行薄层质量提升，根据药材的特征性成分，进行大量筛选试验，每位药材至少选择两种特征性成分。在成分选择过程中，如水龙骨科药材中咖啡酸、绿原酸等成分，因批次间含量差异较大，这些成分无法在所有批次间进行呈现，但可为同用药部位的药材提供参考与经验，通过薄层鉴别可分析特征性成分的稳定性以及批次间的含量差异，为液相含量测定提供依据。

2.4.3 含量测定

根据现有药材标准，处方中各药材并没有包含全部检查项，而且如欧菝葜根、盒果藤根等维药，标准规定的检测项较少。因为，本实验对各药材的重要检测项进行质量提升，如欧菝葜根水分、灰分、酸不溶性灰分，盒果藤根水分等。并为后续企业质量标准建立提供依据。除按照药典规定含量测定项外，对诃子进行诃黎勒酸、鞣花酸，对毛诃子进行鞣花酸、没食子酸、安石榴苷等含量测定。对欧菝葜根进行了落新妇苷的含量测定，但出峰效果不太理想，后续实验室会继续对处方中药材进行含量测定研究。

第3章 毛诃子炮制及质量标准研究

毛诃子含有鞣质类、酚酸类、黄酮类、三萜皂苷、木脂素、脂肪酸等化学成分，具有抗氧化、抗肿瘤、抗菌等药理作用^[29-31]。处方中明确记载毛诃子需要炒黄后使用。然而没有相关的文献报道毛诃子的炮制工艺，对其炮制前后的药理作用变化也没有标准化的研究。因此，本研究参照《全国中药饮片炮制规范》，采用清炒法单因素考察毛诃子的炮制时间，以总皂苷及没食子酸、安石榴苷、鞣花酸3种鞣质类成分为指标，并进行毛诃子炮制前后的体外抑菌能力检测，从减少皂苷含量与提高药效成分两个方面阐述毛诃子的炮制工艺并进行炮制前后的药效学验证。

3.1 实验仪器及材料

3.1.1 实验仪器

LC-20AD 高效液相色谱仪（岛津）；UV-2600 紫外可见分光光度计（岛津）；KQ2500DE 型数据超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司）；DB-型数显电热板（北京市永光明医疗仪器有限公司）；XSR105 电子分析天平（梅特勒托利多上海有限公司）。

3.1.2 实验试剂

香草醛、无水乙醇、高氯酸、冰乙酸（分析纯，国药集团化学试剂有限公司）。甲醇、乙腈为色谱纯，水为实验室自制超纯水。

3.1.3 对照品

人参皂苷 Re 对照品（批号：110754-202330，厂家：中国食品药品检定研究院，纯度 96.9%）；没食子酸（批号：110831-201906，纯度 91.5%，中国食品药品检定研究院）；鞣花酸（批号：11959-201903，纯度 88.8%，中国食品药品检定研究院）；安石榴苷（批号：PS103159，纯度 98.6%，成都普思生物科技股份有限公司）。

3.1.4 药材

毛诃子药材（批号 YL-504-2207003，YL-504-2207005，YL-504-220700，YL-504-2207007 等，厂家：安徽新盛中药饮片有限公司，经本单位检查合格）。

3.2 实验方法

采用单因素法考察炮制时间, 选择(含水量 5%-6%, 长径 2-3 cm)的毛诃子 150 g, 并按《全国中药饮片炮制规范》中“清炒法”相关要求进行翻炒, 温度为文火 80-110℃, 翻炒时间分别 10 min, 20 min, 30 min, 40 min, 50 min, 60 min。翻炒结束后取出放凉至室温, 测定含水量。拍照后采用 photoshop 软件测量炒黄前后药材的色度值。采用紫外分光光度法($\lambda=560\text{ nm}$)对不同炮制时间的毛诃子进行总皂苷的含量测定。采用 Atlantic T3 (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 乙腈-0.1 %磷酸盐为流动相, 梯度洗脱, 体积流量 0.9 mL/min, 进样量 20 μL , 柱温 35 $^{\circ}\text{C}$ 。进行炮制前后没食子酸、安石榴苷、鞣花酸的含量测定以及毛诃子及其最佳炮制品的抑菌能力检测。并建立十批次毛诃子炮制品的质量标准。

3.2.1 色度测定

将各翻炒时间所得照片放入 photoshop 软件中, 将照片分为 4 个象限, 各象限取 3 个值, 将 4 个象限所得的 12 值(Lab 中的“b”代表黄色), 去掉极大值与极小值, 并取平均值进行比较。b 值越大, 炒黄效果越好^[32]。

3.2.2 总皂苷含量测定

3.2.2.1 对照品溶液的制备

称取人参皂苷 Re 对照品 2.05 mg, 加甲醇定容至 10 mL 容量瓶中, 摇匀, 扣除纯度, 计算浓度为 0.1986 mg/mL。

3.2.2.2 标准曲线制作

分别精密吸取人参皂苷 0.2 mL、0.4 mL、0.6 mL、0.8 mL、1.0 mL、1.2 mL 于 10 mL 容量瓶中, 水浴挥干试剂, 加入 0.2 mL 香草醛溶液, 0.8 mL 高氯酸, 使残渣全部溶解, 置 60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中加热 10 min, 取出冰浴冷却后加入 5 mL 冰乙酸, 摇匀后, 以相应试剂为空白, 立即于 560 nm 波长处测定吸光度。

3.2.2.3 供试品溶液的制备

取供试品研细混匀, 称取约 1.25 g, 置于 25 mL 容量瓶中, 加水约 15 mL, 超声 30 min, 冷却后用水定容至刻度, 摇匀。取 10 mL 溶液于离心管中, 2100G 离心 8 min, 取上清液备用。

3.2.2.4 供试品处理

参考《保健食品中总皂苷的测定》(2020年版)中供试品处理方法。

3.2.2.5 方法验证

取毛诃子药材,照“3.2.2”项下方法进行3批次验证。

3.2.3 没食子酸、安石榴苷和鞣花酸含量测定方法

3.2.3.1 色谱条件

色谱柱为 Agilent C18 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈 (A) -0.1%磷酸盐 (B), 梯度洗脱 (0~20 min, 5%~12%A; 20~45 min, 12%~30% A; 45~50 min, 30%~5% A; 50~55 min, 5% A); 流速: 0.9 mL·min⁻¹; 检测波长: 360 nm; 柱温: 35℃; 进样量: 20 μL。

3.2.3.2 对照品溶液配制

取没食子酸, 安石榴苷和鞣花酸对照品适量, 精密称定, 分别加甲醇制成质量浓度依次为 71.8321, 256.7185, 98.3549 μg·mL⁻¹ 的对照品溶液。

3.2.3.3 供试品溶液配制

精密称取干燥的毛诃子粉末 0.1 g, 置 25 mL 容量瓶中, 精密加入 50%甲醇定容至刻度线, 超声 20 min 后, 取上清液过 0.22 μm 滤膜, 即得。

3.2.3.4 方法验证

取3批次毛诃子, 按设定的色谱条件进样, 测定各批次炮制前后没食子酸、安石榴苷、鞣花酸的含量变化。

3.2.4 毛诃子炮制品质量标准研究

3.2.4.1 水分

检查方法按 2020 年版《中国药典》四部通则 0832 水分测定法第二法。

3.2.4.2 灰分

检查方法按 2020 年版《中国药典》四部通则 2302 灰分测定法项下总灰分测定法测定。

3.2.4.3 浸出物

检查方法按 2020 年版《中国药典》四部通则 2201 中冷浸法测定。

3.2.4.4 总皂苷含量

检查方法同“3.2.2”。

3.2.4.5 没食子酸、安石榴苷、鞣花酸含量

检查方法同“3.2.3”。

3.3 实验结果

当炮制 30 min 时。毛诃子炮制品黄度值最高，总皂苷含量变化趋于平缓，三种鞣质类成分含量最高，为毛诃子的最佳炮制工艺。

表 3-1 炒制时间对毛诃子各成分含量的影响

Table 3-1 Influence of roasting time on the content of components of Terminaliae Belliricae Fructus					
炒制时间	黄度平均值	皂苷含量 (%)	没食子酸含量 (%)	安石榴苷含量 (%)	鞣花酸含量 (%)
0 min	9	0.098	2.31	1.25	2.30
10 min	18	0.090	2.47	1.28	2.36
20 min	26.6	0.081	2.70	1.44	2.94
30 min	29.9	0.074	2.85	2.15	3.34
40 min	27.5	0.073	2.64	2.03	3.23
50 min	—	0.071	2.56	1.65	2.48
60 min	—	0.070	2.54	1.22	2.60

3.3.1 色度值测定

随着炮制时间的延长，毛诃子颜色先变黄后变黑，炒制 30 min 时黄度值最高。其中 50 min、60 min 已明显炒焦，略带黑色，不符合炒黄标准，故不予测量。炮制图及炮制时间黄度值如下：

表 3-2 各取样点炮制不同时间下的黄度值
Table 3-2 Yellowness values of each sampling point under different time of concoction

各取样点炮制时间	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	均值
10 min	23	29	23	19	28	27	22	23	24	24	18
20 min	26	31	32	24	33	21	31	23	23	22	26.6
30 min	29	33	30	28	32	32	26	28	31	30	29.9
40 min	32	29	26	26	26	29	27	24	27	29	27.5



图 3-1 毛诃子炒黄图

Figure 3-1 Diagram of chebulin frying and browning

注：1.生品；2.10 min 炮制品；3.20 min 炮制品；4.30 min 炮制品；5.40 min 炮制品；
6.50 min 炮制品；7.60 min 炮制品

Note: 1. Raw products; 2. 10 min artillery products; 3. 20 min artillery products; 4. 30 min artillery products;
5. 40 min artillery products; 6. 50 min artillery products; 7. 60 min artillery products

3.3.2 总皂苷含量测定

3.3.2.1 样品含量测定

随着炮制时间的增加，YL-504-2207007 批毛诃子皂苷含量逐渐下降，在炮制 30 min 后维持稳定。炮制 0 min，10 min，20 min，30 min，40 min，50 min，60 min 的皂苷含量分别为 0.098%，0.090%，0.081%，0.074%，0.073%，0.071%，0.070%。

3.3.2.2 线性关系考察

结果表明, 人参皂苷 Re 浓度在 6.40~33.1 $\mu\text{g/mL}$ 范围内线性关系良好。回归方程为 $Y=40.3535X+0.0414$, $R^2=0.9998$ 。

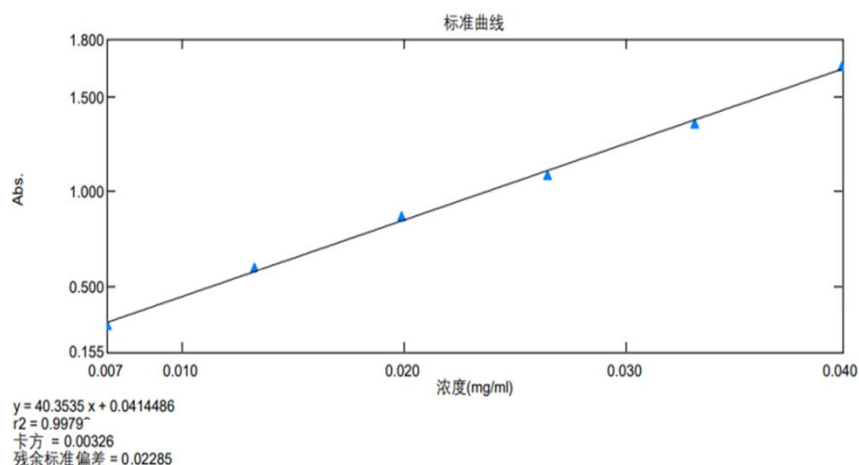


图 3-2 毛诃子总皂苷标准曲线图

Figure 3-2 Standard curve of total saponins of *Quercus serrata*

3.3.2.3 精密度试验

精密吸取同一对照品溶液 6 份, 按“3.2.2.4”项方法显色后测定, 结果吸光度 RSD 为 0.6% ($n=6$)。

3.3.2.4 稳定性试验

取显色后炮制 30 min 后的供试品溶液, 置 1 cm 比色池中, 以空白溶剂校正零点后, 于 560 nm 波长处测定吸光度值, 每隔 5 min 测定一次吸光度共测定 30 min。吸光度 RSD 值为 0.8% ($n=6$)。

3.3.2.5 重复性实验

称取炮制 30 min 后的供试品 6 份, 按样品制备法及显色法, 依法测定, RSD 值为 1.84% ($n=6$)。

3.3.2.6 加样回收率试验

取研细混匀的供试品 (样品批号为 YL-504-2207007), 分别称取 0.6250 g, 共称取 6 份, 置于 25 mL 容量瓶中, 精密加入人参皂苷 Re 对照品储备溶液 2 mL, 按“3.2.2.4”项方法显色后测定并计算回收率。结果总皂苷的平均回收率为 99.74%, RSD 值为 0.67%。

表 3-3 加样回收率实验结果

Table 3-3 Experimental Results of Sample Recovery Ratio							
序号	称样量/g	已知量/mg	加入量/mg	测得量/mg	加样回收率	平均值/%	RSD 值/%
1	0.6252	0.4366	0.3972	0.8345	100.18	99.74	0.67
2	0.6250	0.4365	0.3972	0.832	99.57		
3	0.6254	0.4367	0.3972	0.8336	99.92		
4	0.6250	0.4365	0.3972	0.8365	100.70		
5	0.6252	0.4366	0.3972	0.8296	98.94		
6	0.6251	0.4365	0.3972	0.8302	99.12		

3.3.2.7 方法验证

取毛诃子药材，照“3.2.2.4”项下方法制备 3 批次炮制 30 min 后的炮制品溶液，照“3.2.3.4”项下方法处理该炮制品供试品溶液并进行含量测定。计算总皂苷的含量。经验证后说明实验方法可行。

表 3-4 总皂苷含量测定验证结果

Table 3-4 Validation results of total saponin content determination			
炒制时间	批次 1（%）	批次 2（%）	批次 3（%）
0 min	0.011	0.098	0.092
10 min	0.095	0.090	0.080
20 min	0.084	0.081	0.074
30 min	0.072	0.074	0.068
40 min	0.070	0.073	0.068
50 min	0.070	0.071	0.067
60 min	0.071	0.070	0.078

3.3.3 没食子酸、安石榴苷和鞣花酸含量测定

3.3.3.1 样品含量测定结果

按设定的色谱条件进样，计算峰面积，测定炮制过程中 3 种鞣质类成分的含量。结果表明，炮制 30 min 时，没食子酸含量最高为 2.85%，安石榴苷含量最高为 2.15%，鞣花酸含量最高为 3.34%。色谱图见图 3-3。

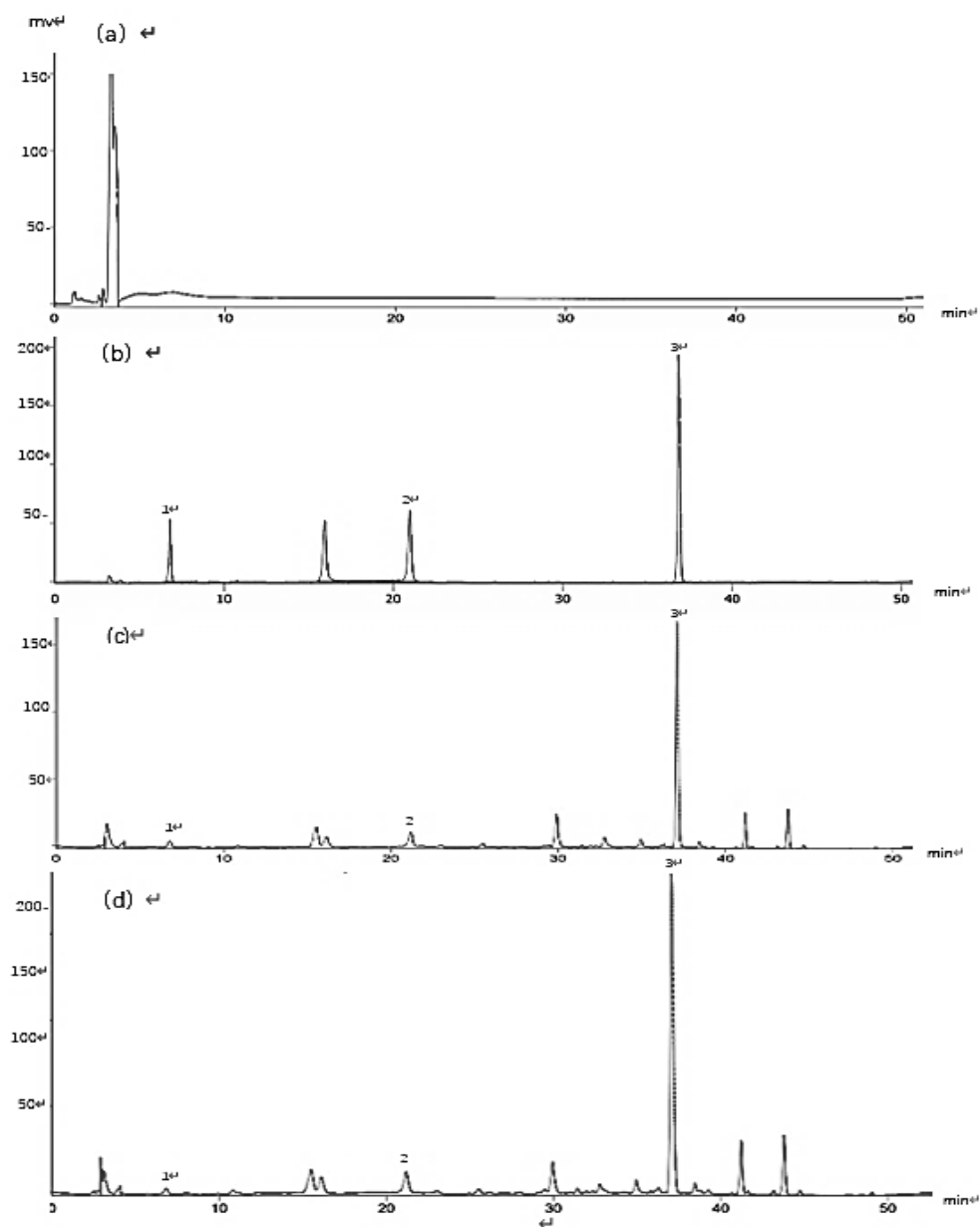


图 3-3 阴性对照、混合对照品、生品及炮制 30 min 后的没食子酸、安石榴苷、鞣花酸色谱图

(a) 空白对照; (b) 混合对照品; (c) 生品; (d) 炮制品

1-没食子酸; 2-安石榴苷 β ; 3-鞣花酸

Figure 3-3 Chromatograms of gallic acid, andrographolide, ellagic acid, and ellagic acid in negative control, mixed control, raw and after 30 min of concoction

(a) Blank solvent (b) Mixed control substance (c) Raw products

(d) Processed product 1- gallic acid ;2. Andrographolide- β ;3. ellagic acid

3.3.3.2 线性关系考察

同 2.3.3.6 毛诃子含量测定项下“线性关系考察”

3.3.3.3 精密度试验

精密称取同一批次毛诃子供试品连续进样 6 次，记录各组色谱峰峰面积。结果没食子酸、安石榴苷、鞣花酸的峰面积 RSD 分别为 0.84%、0.98%、0.42%。说明仪器精密度良好。

3.3.3.4 稳定性试验

精密称取同一批次毛诃子供试品分别在样品制备后 0、2、4、8、12、24 h 进样，记录各组色谱峰峰面积。结果没食子酸、安石榴苷、鞣花酸 RSD 值分别为 0.31%、0.45%、0.24%。说明测定成分在 24 h 内稳定性良好。

3.3.3.5 重复性试验

精密称取同一批次毛诃子供试品 6 份进样，记录各组色谱峰峰面积。结果没食子酸、安石榴苷、鞣花酸的质量分数 RSD 分别为 2.05%、1.75%、1.23%。说明该方法重复性良好。

3.3.3.6 加样回收率试验

取已测定的炮制 30 min 供试品 6 份，精密称定，分别加入对照品溶液，按上述色谱条件进样测定，测得安石榴苷、鞣花酸的平均加样回收率分别为 98.81%、97.52%、98.44%。RSD 值分别为 1.65%、1.88%、1.42%。结果表明该方法加样回收试验结果良好。

3.3.3.7 方法验证

取 3 个不同批次毛诃子样品，按设定的色谱条件进样，计算峰面积，测定炮制前后 3 个成分的含量。结果表明均在炮制 30 min 时，三种鞣质成分含量最高。三批次的没食子酸含量分别为 2.81%、2.76%、2.86%。安石榴苷的含量分别为 2.00%、2.14%、2.06%。鞣花酸的含量分别为 3.22%、3.32%、3.25 %。说明该方法可行。

表 3-5 三批次验证结果

Table 3-5 Three batches of validation results			
批次	没食子酸含量%	安石榴苷含量%	鞣花酸含量%
1	2.81	2.00	3.22
2	2.76	2.14	3.32
3	2.86	2.06	3.25

3.3.4 毛诃子及其炮制品的 MIC 值测定

参照二倍稀释法原则,依次向无菌试管第1~13管内加入9 mL的营养肉汤,在第1管中分别加入20 mg/mL的药物原液(毛诃子生品、毛诃子30 min炮制品)9 mL,然后吸取9 mL至第2管,如此连续倍比稀释至第11管,第12管为不含药物的阳性对照,第13管为不含菌液的阴性对照。1-11管每管加入1 mL大肠杆菌菌液(菌液浓度为 1×10^5)。此时各管药物浓度依次为9、4.5、2.25、1.13、0.57、0.28、0.14、0.07、0.035、0.018、0.009 mg/mL^[33]。将试管放入培养箱内培养24 h后观察,观察澄清度确定最低抑菌浓度(MIC)。结果表明毛诃子生品、毛诃子30 min炮制品大肠杆菌的MIC值分别为2.25 mg/mL、0.57 mg/mL。说明炮制后毛诃子的抑菌效果有显著提高。

3.3.5 毛诃子药材炮制品质量标准建立

3.3.5.1 炮制品水分

经检查,毛诃子炮制品水分在4.65%~5.74%之间。质量提升标准为炮制品水分不得高于6.3%。

3.3.5.2 灰分

经检查,毛诃子炮制品总灰分在15.79%~32.76%之间。质量提升标准为炮制品灰分不得高于5.3%。

3.3.5.3 浸出物

经检查,毛诃子炮制品浸出物在43.72%~52.57%之间。质量提升标准为炮制品浸出物不得低于38.4%。

3.3.5.4 总皂苷含量

经检查,毛诃子总皂苷含量在0.064%~0.080%之间。质量提升标准为炮制品总皂苷不得高于0.08%。

3.3.5.5 没食子酸、安石榴苷、鞣花酸含量

经检查,毛诃子炮制品没食子酸含量在2.33%~2.88%之间。毛诃子炮制品安石榴苷酸含量在1.42%~2.27%之间。毛诃子炮制品没食子酸含量在2.75%~3.86%之间。质量提升标准为炮制品没食子酸含量不得低于2.0%,没食子酸含量不得低于1.4%,没食子酸含量不得低于2.6%。

3.3.5.6 毛诃子炮制品含量测定结果

表 3-4 毛诃子炮制品药材检查结果

Table 3-4 Inspection results of herbs of Chebulbulin products								
药材名称	批号	水分%	总灰分%	浸出物%	总皂苷含量 (%)	没食子酸 (%)	安石榴苷 (%)	鞣花酸 (%)
毛诃子 炮制品	1	4.72	4.64	47.20	0.072	2.64	2.03	3.34
	2	4.65	4.52	44.14	0.074	2.44	1.58	3.52
	3	5.42	4.36	44.10	0.068	2.52	1.42	2.75
	4	5.60	4.25	43.72	0.069	2.33	2.27	3.23
	5	5.41	4.42	50.11	0.076	2.63	2.25	3.44
	6	5.55	4.60	52.53	0.064	2.45	1.85	3.15
	7	5.67	4.25	46.76	0.080	2.52	1.66	3.10
	8	5.65	4.44	52.57	0.071	2.69	1.87	3.72
	9	5.12	4.62	51.96	0.075	2.76	1.64	3.86
	10	4.82	4.70	46.66	0.071	2.88	1.53	3.42

毛诃子炮制品质量标准为水分不得高于 6.3%。灰分不得高于 5.3%。浸出物不得低于 38.4%。总皂苷不得低于 0.08%。没食子酸含量不得低于 2.0%，没食子酸含量不得低于 1.4%，没食子酸含量不得低于 2.6%。

3.4 讨论

毛诃子所含化学成分丰富，其提取物和所含单体成分具有保肝、降血糖、调血脂、抗肿瘤、抗病原微生物、抗氧化等药理作用^[34]。然而，《中国药典》2020 年版并没有对毛诃子指标性成分的含量测定项，限制了其饮片及相关复方制剂的有效评价。另外，由于毛诃子的药效物质基础不明，限制了其药材的质量规范和临床安全合理应用。现阶段毛诃子的药效研究主要集中在原药材提取物层面，并未对炮制品进行药效学的研究^[35-36]。其单体成分研究以没食子酸等简单酚酸类化合物为主，而对皂苷类等其他类型成分的研究相对缺乏。因此本实验进行了毛诃子炮制前后没食子酸、安石榴苷、鞣花酸以及总皂苷的含量测定，并进行体外药效学的验证。建立了毛诃子炮制品的质量标准，并为其代表制剂经典名方买朱尼吾西拜的工艺优化提供依据。

在总皂苷含量测定方法的建立上本试验参考了董宇^[37]等建立的方法，进行了毛诃子生品及炮制品的总皂苷的测定。在毛诃子液相方法的建立上本试验参考了欧亮苗^[38-40]等建立的方法，考察了检测波长，溶剂以及流动相的选择。结果表明在 360 nm 波长处，

采用 50% 甲醇作为溶剂超声提取，磷酸盐浓度为 0.1% 时，色谱峰分离度最佳。当甲醇作为有机相时，鞣花酸、安石榴苷- β 与杂质峰并在一起难以被分离，故最终确定以乙腈-0.1% 磷酸水溶液为流动相^[41]。

经过对毛诃子鞣质类及总皂苷的含量测定，发现毛诃子在炮制 30 min 后，3 种鞣质类药效成分达到最大值，没食子酸含量从 2.31% 升高到 2.85%， β -安石榴苷含量从 1.26% 升高到 2.15%，鞣花酸含量从 2.29% 升高到 3.34%。而有心脏毒性的皂苷类成分逐渐下降，最终趋于平缓。在此条件下，粉末颜色由浅黄色转变为土黄色，色度值中黄度最高。综合上述实验结果确定毛诃子的最佳炮制条件为 30 min，并在此基础上进行药效学验证。炮制后毛诃子的抑菌活性逐渐提高，其代表制剂买朱尼吾西拜对大肠杆菌的抑菌效果也极强。抑菌率已经达到 90%。然而据报道毒性小鼠口服毛诃子醇提取物的 LD₅₀ 为 4.25 mg/kg。药材毒性可能与其所含的具有心脏毒性的甾体皂苷成分有关。结构为 3-O- β -D-galactopyrano-syl- (1-4) -O- α -L-rhamnopyranoside^[42-43]。毛诃子中皂苷成分含量低，峰面积小，分离度差。对照品无处购买等诸多问题使得毛诃子总皂苷指纹图谱液相方法的建立存在着较大困难。对其指纹图谱的建立以及炮制增效减毒的药效机制有待进一步研究。

本实验建立了毛诃子的标准化的炮制工艺标准，对 3 种鞣质类及总皂苷成分进行含量测定研究，并通过方法学考察验证了分析方法的可靠性。并从体外药效学进行验证。将其化学成分与药理作用研究相结合，为毛诃子的清炒工艺提供参考。然而对其药效学在抗菌、降血压、抗凝血、保护血管、抗动脉粥样硬化和抗抑郁等方面的探讨相对不足，对其药理作用机制仍需进一步探讨。

第4章 买朱尼吾西拜物质基准样品研究

中间体粉末制备时选择不同的粉碎工艺，其粉体的物理性质、粒径、营养成分的溶出率也会发生改变^[44-45]。不同药材的粉碎特性差异较大，主要受油脂含量、硬度、水分、入药部位、成分含量等影响，针对上述影响因素综合调整粉碎工艺参数^[46-47]。

买朱尼吾西拜是由欧菝葜根、番泻叶、地锦草、余甘子等十味药材组成的维吾尔药蜜膏剂，其药用部位包括果实、根茎、全草、叶片，蜜膏剂以原药材细粉入药，因此药粉细度与流动性对后续物质基准样品质量影响较大，根据其性质的复杂多样，故对各药味进行单独粉碎特性考察后。使用传统粉碎工具铁船进行粉碎，通过研究出粉率及粉体流动性等因素综合评分来确定饮片的粉碎方式，确定买朱尼吾西拜的传统粉碎工艺。并以金丝桃苷与鞣花酸的 RSD 值为指标，进行混合均一度的测定来确定最佳混合工艺。

4.1 实验仪器及材料

4.1.1 仪器

LC-20AD 高效液相色谱仪（岛津）；丝绸筛（实验室自制，约药典六号筛，粉碎工艺使用）、丝绸筛（实验室自制，约药典三号筛，混合工艺使用）、铁船、铜臼、石磨。

4.1.2 试剂

甲醇、乙腈为色谱纯，其余试剂为分析纯，水为实验室自制超纯水。

4.1.3 对照品

同“2.1.3”项下对照品。

4.1.4 药材

同“2.1.4”项下药材。

4.2 实验方法

4.2.1 粉碎工具考察

使用铁船、铜臼、石磨三种粉碎工具，投料量为各容器容积的 $1/3$ ，通过对比各容器在 5 min、10 min、15 min、20 min 的出粉率，选择各药材的最佳粉碎工具。出粉率 (%) = (药材质量-未过筛药材质量)/药材质量 $\times 100\%$ 。

4.2.2 投料体积考察

使用粉碎工具铁船，投料体积分别为容器容积的 $1/3$ ，容器总体积的 $2/3$ ，容器总体积的 $3/3$ 。通过对比各容器在上述粉碎时间的出粉率，选择各药材的最佳投料量。

4.2.3 出粉率测定

依据考察的投料体积及铁船进行粉碎，每 5 分钟过一次丝绸筛，计算出粉率，出粉率 $>95\%$ 后停止粉碎，记下累计时间，或记下出粉率不再变化时的累计时间所对应的出粉率。将此出粉率记为定出粉率。用于考察饮片整体粉碎的难易程度。(注：各药材粉碎前控制水分 $<5\%$)

将测量完定出粉率的药材再粉碎 5 分钟，过筛，将此出粉率记为初出粉率。用于考察饮片粉碎的完整程度。

将粉碎后过药典六号筛的药材在室温，湿度 $\leq 50\%$ 的条件下放置三天，再次过丝绸筛，计为次出粉率。(部分饮片油性物质多，粉碎后会导致粉体聚集，因此粉碎后细粉以室温，湿度 $\leq 50\%$ 的条件下放置三天后再过筛。用于考察饮片粉碎的稳定程度)。

出粉率 = $0.3 \times \text{定出粉率} + 0.4 \times \text{初出粉率} + 0.3 \times \text{次出粉率}$ 。

4.2.4 休止角的测定及综合评分

将样品从漏斗缓缓加入，使样品堆积在平台并缓慢形成圆锥体，当圆锥体形状不再改变时，锥体斜面与平面的夹角即为休止角。每类样品均测定 3 次，取平均值。休止角越小，代表摩擦力越小，流动性越好。

当 $\theta = 30^\circ$ 时，流动性记为 100 分。

当 $30^\circ < \theta < 45^\circ$ 时，即满足生产需要，在此区间休止角增加 1° 扣 0.5 分。

当 $45^\circ < \theta < 60^\circ$ 时，流动性略差，在此区间休止角增加 1° 扣 1 分。

当 $\theta > 60^\circ$ 时，流动性差，在此区间休止角增加 1° 扣 2 分。

综合评分 = 出粉率得分 $\times 80\%$ + 休止角得分 $\times 20\%$ 。

4.2.5 单独粉碎考察

十味药材分别称取 $1/6$ 处方倍量 ($1/3$ 铁船容积) 进行粉碎，每 5 分钟过一次丝绸筛，计算出粉率，出粉率 $>95\%$ 后停止粉碎，记下累计时间，或记下出粉率不再变化

时的累计时间所对应的出粉率。

4.2.6 混合粉碎考察

4.2.6.1 按不同药用部位混合粉碎

本处方部分药材油性物质含量相对较多，故单独粉碎到一定粒度后，粉体容易聚集。当不同药材进行混合粉碎时，可以根据粉末表面能的减少而降低粉末结块粘壁现象，更有利于粉碎。故依据药味的单独粉碎性质和组成，按照药用部分将十味药材分为三类，根类：水龙骨、欧菝葜根、盒果藤根。果实类：余甘子（奶泡）、诃子（炒黄）、毛诃子（炒黄）、西青果（炒黄）、草叶类：地锦草、番泻叶、菟丝草。粉碎工具铁船，每组投料量药材均为处方量的 1/6。出粉率考察同 4.2.3 项下实验方法。休止角测定同 4.2.4 项下实验方法。考察结果见表 4-6

粉碎方式考察如下：

- ① 草叶类
- ② 根类
- ③ 果实类
- ④ 草叶类+根类
- ⑤ 草叶类+果实类
- ⑥ 果实类+根类
- ⑦ 草叶类+果实类+根类

4.2.7 粉碎工艺验证

按照处方量的 1/6，称取各味药材进行粉碎，粉碎 20 min，选取三批次进行粉碎工艺验证，每批次平行三次，各药材粉碎前控制水分<5%。

4.2.8 混合工艺研究

在粉碎工艺基础上，继续考察买朱尼吾西拜的混合工艺，以期得到均一稳定的中间体粉末。药物粉末混合均匀度与物料性质、混合设备、混合工艺条件有关。在物料和设备固定的情况下，调整混合工艺条件尤为重要。查阅相关文献资料，参考药审中心发布的《化药口服固体制剂混合均匀度和中控剂量单位均匀度研究技术指导原则（试行）》，进行买朱尼吾西拜的混合工艺研究，RSD 值<5%表明混合均匀。

4.2.9 混合工具确认

古法混合无类似现代先进设备，无相关工具的记录。考虑到这一工艺特点和实验

室经验，选用“过筛混合”的方式进行考察，最终确定为丝绸筛（约等于药典三号筛，50目）进行混合。

4.2.10 混合次数考察

取一个处方量的经粉碎过丝绸筛的买朱尼吾西拜 10 味药材混合粉末，过筛混合数次，分别于过筛 0 次，5 次，10 次，15 次后取样检测。每次取样 9 个点，按九宫格取样法进行（如下图 1 所示），每个点取样 3 份，一份用于检测，另外两份封存备用。



图 4-1 传统混合工艺取样图示

Figure4-1 Sampling illustration of the traditional mixing process

4.2.11 混合工艺含量测定

对混合次数分别为 0 次、5 次、10 次、15 次的中间体粉末进行金丝桃苷与鞣花酸的含量测定。

（1）对照品溶液的制备：取金丝桃苷、鞣花酸对照品适量，分别加 50% 甲醇配制成每 1 mL 含金丝桃苷 5 μg 、鞣花酸 150 μg 的对照品溶液。

（2）供试品溶液的制备：称取 1 g 粉末，加入 50% 甲醇，定容至 25 mL，摇匀后，超声 30 min，放冷，过滤，即得。

（3）色谱条件与系统适用性实验：流动相：乙腈 0.1% 磷酸溶液（15：85），检测波长：360 nm，柱温：35 $^{\circ}\text{C}$ ，进样量：10 μL 。

4.2.12 混合工艺工艺验证

经混合次数考察，确定了最佳混合次数为 10 次，更换 3 个批次的买朱尼吾西拜中间体，混合 10 次后，进行混合工艺验证。

4.3 实验结果

4.3.1 粉碎工具考察

通过对比药材在各容器内 5 min、10 min、15 min、20 min 的出粉率，最终选择铁船作为粉碎工具。

表 4-1 粉碎工具考察

Table 4-1 Examination of Crushing Tools

不同粉碎时间出粉率	铁船-出粉率（%）				铜臼-出粉率（%）				石磨-出粉率（%）			
	5min	10min	15min	20min	5min	10min	15min	20min	5min	10min	15min	20min
欧菝葜根	32.9	55.0	69.5	83.5	2.0	4.5	7.0	8.9	10.8	25.7	38.9	48.1
盒果藤根	22.7	60.1	79.8	94.2	4.1	11.4	16.2	21.6	33.0	54.6	61.2	69.2
番泻叶	92	100	\	\	59.7	87.2	\	\	39.1	60.2	\	\
地锦草	51.6	85.4	96.8	\	26.5	44.3	58.1	\	28.9	41.7	50.3	\
诃子	33.5	50.2	58.3	66.2	11.7	19.4	29.5	36.0	21.6	40.0	49.8	50.0

4.3.2 投料体积考察

使用粉碎工具铁船，投料体积分别为容器容积的 1/3，容器总体积的 2/3，容器总体积的 3/3。最终发现，当投料体积为容器容积的 1/3 时，粉碎最容易，出粉率最高，当投料体积为容器容积的 2/3 时，粉碎出粉率下降，当投料体积为容器容积的 3/3 时，大多数药材无法粉碎。综合考虑后，将每组投料量定为容器容积的 1/3 时为最佳投料体积，经讨论将该投料体积确定为处方量的 1/6 倍量。

表 4-2 投料体积考察

Table 4-2 Examination of feeding volume

药材名称	占容器容积	10min
欧菝葜根	1/3	55.0
	2/3	16.4
	3/3	\
盒果藤根	1/3	49.6
	2/3	27.6
	3/3	15.4
诃子（炮）	1/3	50.2
	2/3	过硬不易操作
	3/3	\
毛诃子（炮）	1/3	54.8
	2/3	过硬不易操作
	3/3	\
地锦草	1/3	85.4
	2/3	53.6
	3/3	\
番泻叶	1/3	100
	2/3	95.8
	3/3	\

4.3.3 单独粉碎考察

十味药材分别称取 1/6 处方倍量进行粉碎，每 5 分钟过一次丝绸筛，计算出粉率，出粉率 > 95% 后停止粉碎，记下累计时间。结果发现药材单独粉碎时，果实类药材油性大易粘壁，粉碎难，质硬不适合单独粉碎，草叶类药材质软，粒径大。故综合考虑后进行多药材混合粉碎。单味药材粉碎特性、出粉率以及综合评分见下表。

表 4-3 单独粉碎药材特性

Table 4-3 Characteristics of individually pulverized herbs

药材名称	药用部位	药材质地	粉碎 难易	粉碎特点		
				粘壁情况	过筛情况	粒径大小
菟丝草	地上全草	质松	易	易粘壁	易过筛	粒径大
水龙骨	根	质密, 坚硬	难	不粘壁	易过筛	粒径小
西青果 (炮)	果实	质硬, 脆	易	易粘壁	难过筛	粒径小
余甘子 (炮)	果实	质硬, 酥韧	易	不粘壁	易过筛	粒径小
番泻叶	叶片	质松	易	不粘壁	易过筛	粒径小
欧菝葜根	根	质硬, 坚韧	难	易粘壁	难过筛	粒径大
盒果藤根	根	质硬, 脆	易	易粘壁	难过筛	粒径大
地锦草	地上全草	质松	易	易粘壁	易过筛	粒径大
诃子	果实	质硬	难	易粘壁	难过筛	粒径小
毛诃子	果实	质硬	难	易粘壁	难过筛	粒径小

表 4-4 单独粉碎出粉率考察

Table 4-4 Examination of the powder yield of separate crushing

药材	5min (%)	10min (%)	15min (%)	20min (%)	25min (%)	30min (%)
欧菝葜根	32.9	55	69.5	83.5	94.7	99.8
盒果藤根 (去木芯)	22.7	60.1	79.8	94.2	97.7	\
水龙骨 (切小块)	30.8	55.6	78.0	90.5	96.7	\
诃子 (炒黄)	33.5	50.2	58.3	66.2	70.6	70.7
毛诃子 (炒黄)	40.3	54.8	70.3	80.2	83.2	83.1
西青果 (炒黄)	76.7	96.4	\	\	\	\
地锦草	51.6	85.4	96.8	\	\	\
菟丝草	45.5	61.9	73.9	83.4	88.4	91.1
余甘子 (奶泡)	40.3	60.4	80.9	95.4	\	\
番泻叶	92.0	100	\	\	\	\

表 4-5 单独粉碎综合评分计算表

Table 4-5 Individual Crush Composite Score Calculation Table							
药材名称	出粉率（%）			出粉率 得分	休止角 度数	休止角 得分	综合 评分
	定出粉率 （%）	初出粉率 （%）	次出粉率 （%）				
欧菝葜根	94.7	99.8	99.7	98.2	45.8	91.5	96.9
盒果藤根 （去木芯）	97.7	99.4	99.8	99.0	47.2	90.5	97.3
水龙骨 （切小块）	96.7	99.2	99.6	98.6	45	92.5	97.4
诃子 （炒黄）	70.6	70.7	99.7	79.4	53.3	84.5	80.4
毛诃子 （炒黄）	83.2	83.3	99.8	88.2	52.4	85	87.6
西青果 （炒黄）	96.4	100	99.8	98.9	50.7	86.5	96.4
地锦草	96.8	100	99.9	99.0	42.2	94	98
菟丝草	91.1	93.2	99.7	94.5	41	94.5	94.5
余甘子 （奶泡）	95.4	100	99.5	98.5	49.5	88	96.4
番泻叶	100	100	99.9	100	38.9	95.5	99.1

4.3.4 混合粉碎考察

4.3.4.1 按不同药用部位混合粉碎

参照 4.2.3 项下“出粉率考察方法”及 4.2.4 项下“休止角测定”，混合粉碎考察结果见表 4-6。

表 4-6 混合粉碎出粉率考察

Table 4-6 Mixed crushing powder yield examination

粉碎时间及出粉率	5 min	10 min	15 min	20 min	25 min	30 min
草叶类	78.6%	96.4%	\	\	\	\
根类	42.5%	56.3%	66.9%	90.8%	97.7%	\
果实类	68.8%	90.7%	99.2%	\	\	\
草叶类+果实类	71.9%	93.4%	99.5%	\	\	\
草叶类+根类	43.5%	67.0%	81.8%	95.9%	\	\
果实类+根类	33.1%	53.2%	69.4%	83.1%	93.9%	98.1%
草叶类+果实类+根类	44.8%	68.7%	85.7%	97.9%	\	\

表 4-7 混合粉碎综合评分计算表

Table 4-7 Calculation of Mixed Crush Composite Score

药材种类	出粉率 (%)			出粉率 得分	休止角	休止角 得分	综合评 分
	定出粉率 (%)	初出粉率 (%)	次出粉率 (%)				
草叶类	97.6	100	100	99.3	41.1	94.5	98.3
根类	94.4	99.1	99.8	97.9	45.7	92	96.8
果实类	96.5	97.4	99.2	97.7	52.5	85	95.2
草叶类+果实类	99.4	100	99.6	99.7	44.3	93	98.4
草叶类+根类	95.9	99.5	99.9	98.5	42.8	94.5	97.7
果实类+根类	98.1	99.4	99.7	99.1	49.4	88	96.9
草叶类+果实类 +根类	98.7	100	100	99.6	44.8	92.5	98.2

4.3.5 粉碎工艺验证

按照各药材处方倍量的 1/6 粉碎 20 min，进行三批次的粉碎工艺验证，粉碎 20 min 后，三批次药材的出粉率分别为 98.1%，97.8%，98.3%。RSD 值为 0.26%，粉碎工艺稳定可行。

表 4-8 混合粉碎综合评分计算表（n=3）

Table 4-8 Calculation of Mixed Crush Composite Score					
批号	药材质量 (g)	细粉重量 (g)	出粉率 (%)	平均出粉率 (%)	RSD 值 (%)
1	33.50	32.86	98.1	98.1	0.26
2	33.52	32.78	97.8		
3	33.51	32.94	98.3		

4.3.6 混合工艺结果

混合次数分别为 0 次、5 次、10 次、15 次的中间体粉末，其金丝桃苷与鞣花酸含量与 RSD 值结果见表 4-9，结果表明混合 10 次时为最佳混合工艺。

表 4-9 不同混合次数下各成分含量及 RSD 值

Table 4-9 Content and RSD value of each component under different mixing times				
次数	鞣花酸含量 均值%	金丝桃苷含量 均值%	鞣花酸 RSD 值%	金丝桃苷 RSD 值%
0	1.204	0.054	4.52	7.65
5	1.211	0.056	2.00	2.46
10	1.218	0.059	0.89	0.75
15	1.213	0.056	1.12	0.98

4.3.7 混合工艺验证

经混合次数考察，确定了最佳混合次数为 10 次，更换 3 批次的买朱尼吾西拜物质基准样品后，混合 10 次后，进行混合工艺验证，通过三批不同批次药材的混合工艺验证结果来看，指标成分金丝桃苷及鞣花酸均混匀，说明该工艺稳定可行。

表 4-10 混合工艺验证结果

Table 4-10 Mixing process validation results		
批次	鞣花酸 RSD 值%	金丝桃苷 RSD 值%
1	0.93	1.02
2	0.88	0.72
3	0.85	0.73

4.3.8 物质基准样品含量测定

使用铁船粉碎 20min 后过筛混合 10 次，制备 10 批次的物质基准样品进行研究。结果表明综合出粉率在 97.1%~99.0%之间，休止角度数在 42.1~49.6 之间，鞣花酸 RSD 值在 0.89%~1.36%之间，金丝桃苷 RSD 值在 0.84%~1.23%之间。制备的十批次物质基准样品均符合标准。

表 4-11 物质基准样品研究
Table 4-11 Substance Reference Sample Study

批次	综合出粉率%	休止角度数	鞣花酸 RSD 值%	金丝桃苷 RSD 值%
1	98.5	43.2	1.06	0.86
2	97.6	42.8	1.24	1.23
3	97.4	49.6	1.32	1.22
4	97.8	49.4	0.92	0.95
5	98.8	48.5	0.96	0.91
6	98.5	46.6	1.02	0.92
7	97.1	44.8	1.15	0.84
8	99.0	43.5	0.89	0.96
9	98.3	42.1	0.99	1.11
10	98.6	43.5	1.25	1.16

4.4 讨论

买朱尼吾西拜采取全药材 1/6 处方量粉碎，并混合 10 次为最佳工艺。由粉碎工艺实验结果可知，买朱尼吾西拜 10 味药材混合粉碎，粉碎效率最高，易于过筛，可操作性强，改善了单独粉碎易粘筛、堵塞筛孔、粉尘大的问题，优于单独药材和部分混合粉碎。因此买朱尼吾西拜的最佳粉碎方式为使用铁船粉碎，投料量为处方倍量的 1/6，粉碎 20 min 后过筛，收集细粉即得。由混合工艺实验结果可知，经过铁船粉碎全药材粉碎后的药材粉末不均匀，可见虽然是全药材混合粉碎，但粉碎前的粗混状态并不能使粉末均一，因此需要进行混合工艺测定。从买朱尼吾西拜中间体粉末的同一批次的不同混合次数的指标成分 RSD%来看，混合 10 次数据相对较好，因此，将混合 10 次作为最佳混合次数，并进行后续三批工艺验证。

第5章 买朱尼吾西拜药效学研究

本实验按照《中国药典》2020 版三部通则 1106, 研究买朱尼吾西拜及单药材粉末对大肠杆菌、铜绿假单胞菌、白色念球菌的抑菌效果, 进行体外抑菌浓度 (MIC) 及最小杀菌浓度 (MBC) 的测定。通过建立急性尿路感染 UTI 小鼠模型, 连续给予买朱尼吾西拜混悬液 2 周, 选择左氧氟沙星作为阳性对照。通过观察小鼠状态、体重监测、小鼠尿液中含菌量的变化以及观察 HE 染色后组织病理形态的改变, 评价买朱尼吾西拜对尿路感染的药效作用。

5.1 实验仪器及材料

5.1.1 实验动物

BALB/c 小鼠, 雌性, 体重 18-22 g, 90 只, 购自新疆医科大学动物实验中心, 实验动物许可证号: SCXK (新) 2019-0001, 饲养于新疆华世丹药物研究有限责任公司动物实验室, 饲养环境: 室温 22~27 °C, 相对湿度为 40% ~60%。本实验所有的操作步骤都符合国家科技委员会对动物实验研究管理的规定。

5.1.2 实验细菌

大肠杆菌 (菌种编号: ATCC25922, 厂家: 上海微生物典藏中心)、
白色念球菌 (菌种编号: B81823, 厂家: 上海微生物典藏中心)、
铜绿假单胞菌 (菌种编号: CMCC 10104, 厂家: 上海微生物典藏中心)。

5.1.3 实验仪器

紫外分光光度计 (型号: UV-2600, 岛津企业管理有限公司)、TGL-16M 低温高速离心机 (上海卢湘仪离心机仪器有限公司)、SPX-250B-Z 型生化培养箱 (上海博讯实业有限公司医疗设备厂)、MJP-80 霉菌培养箱 (北京市永光明医疗仪器有限公司)、SHA-A 数显恒温振荡器 (常州天瑞仪器有限公司)、生物安全柜 (乌鲁木齐祥生仪器有限公司)、超声波清洗器 (批号: KQ5200DE, 昆山市超声仪器有限公司)、电热鼓风干燥箱 (型号: 101-2ES, 北京市永光明医疗仪器有限公司)、TDL-5 电动离心机 (江苏金怡仪器科技有限公司)。

5.1.4 实验试剂

营养肉汤（青岛日水生物技术有限公司）麦康凯液体培养基（批号：802M031，厂家：Solarbio 公司）、麦康凯琼脂培养基（批号：602M031，厂家：Solarbio 公司）、买朱尼吾西拜中间体混悬液（实验室自制，批号：20240217）、左氧氟沙星片（批号：221027，厂家：桂林药业股份有限公司）、水合氯醛（批号：20120727，厂家：上海山浦化工有限公司）、PE10 聚乙烯导管（规格：英制尺寸，内径：0.28 mm，外径：0.64 mm）、二甲苯（批号：2014021，厂家：天津市百世化工有限公司）、甲醛溶液（批号：110419，厂家：四川西陇化工有限公司）、HE 染色试剂盒（批号：20221122，厂家：北京索莱宝科技有限公司）、中性树胶（批号：20220708，厂家：上海标本模型厂）、无水乙醇（批号：20230105，厂家：天津欧博凯化工有限公司）。

5.2 实验方法

5.2.1 体外抑菌实验方法

5.2.1.1 菌液制备

用接种环挑取购买的菌落，用平板划线法接种在麦康凯培养基中，置 37℃培养 24 h，用接种环挑取强壮菌落 2-3 个移至 100 mL 麦康凯液体培养基中，置 37℃培养 24 h，待检前调节菌液浓度至 0.5 麦氏比浊管浊度。

备注：0.5 麦氏比浊管浊度：刮取细菌重悬于 PBS 中，根据 600 nm 处所测的吸光度值（应用紫外分光光度计在波长 600 nm 的条件下调整菌液的 OD 值至 0.1-0.2 之间）：即 0.5 Mc（含菌 1×10^8 CFU/mL），调整至适宜实验的菌液浓度。

5.2.1.2 灭菌

实验前后，超净工作台及微生物间均需用紫外照射半小时，将配制好的培养基，配套枪头，离心管、试管，广口瓶放入高压灭菌锅中，121℃杀菌 25 min。

5.2.1.3 药液的制备

分别称取 2 g 的全方粉末、欧菝蓼根粉末、番泻叶粉末、地锦草粉末，加入到 100 mL 已高压过的麦康凯液体培养基中，配制成 20 mg/mL 的药液。

5.2.1.4 试管法药液稀释

取无菌试管 13 支，排成一排，每管加入营养肉汤 9 mL，在第 1 管加入抗菌药物原

液 (20 mg/mL) 9 mL 混匀, 然后吸取 9 mL 至第 2 管, 混匀后再吸取 9 mL 至第 3 管, 如此连续倍比稀释至第 11 管, 并从第 11 管中吸取 9 mL 弃去, 第 12 管为不含药物的阳性对照, 第 13 管为不含菌液的阴性对照。1-11 管每管加入 1 mL 菌液 (菌液浓度为 1×10^5) 此时各管药物浓度依次为 9、4.5、2.25、1.13、0.57、0.28、0.14、0.07、0.035、0.018、0.009 mg/mL。判定终点: 凡清澈透明的试管判为无菌生长, 以无菌生长的最低药物浓度为该药对试验菌的 MIC 值。

备注: 大肠杆菌、铜绿假单胞菌加入麦康凯培养基, 白色念球菌改为加入胰酪大豆胨液体培养基。

5.2.1.5 平板涂布

将 MIC 值对应的药物浓度及高于此浓度的进行平板涂布, 大肠杆菌、铜绿假单胞菌使用胰酪大豆胨琼脂培养基, 白色念球菌使用沙氏葡萄糖琼脂培养基。将琼脂培养基趁热倒入培养皿中, 待其凝固, 吸取上述 MIC 值对应的药物浓度及高于此浓度的试管的上清液, 吸取 100 μ L 加入培养基中, 进行涂布。观察各浓度长菌情况。

判定终点: 以平板上无菌生长的最低药物浓度为该药对试验菌的 MBC 值。

5.2.2 尿路感染 UTI 模型方法

5.2.2.1 菌液制备

取出冻存 ATCC25922 大肠埃希菌株, 在 55°C 水浴锅中解冻 (约 20 s) 后, 在 35°C 水浴中轻摇 2 min, 吸取 100 μ L 菌液将其放入 100 mL 已配置好的胰酪胨大豆液体培养基中, 摇匀后放入 35°C 细菌培养箱培养 2 天。取出培养好的菌液, 使用麦氏比浊计数, 后用生理盐水稀释成 10^8 CFU/mL 浓度的菌液。将稀释好的菌液保存在 35°C 的水浴锅中。以上操作均在超净工作台中完成。

5.2.2.2 尿路感染模型的建立

将小鼠适应性喂养 3 天后, 将 90 只雌性小鼠随机分为空白组和模型组, 空白组 10 只, 模型组 80 只。于第一天、第三天进行大肠杆菌菌液感染, 感染前禁水过夜, 使用 5% 水合氯醛 (400 mg/kg) 腹腔注射麻醉, 麻醉后, 将小鼠尿道口用 75% 酒精棉进行消毒, 用小镊子将尿道口左上一侧皮肤呈 45-60 度角提上, 提起尿道外口的皮肤, 将 PE10 导管缓缓插入尿道, 约为 1-2cm, 再使用 1mL 注射器连接 PE10 导管, 缓缓注入 300 μ L 的菌液 (10^8 CFU/mL), 空白组每只小鼠注射 300 μ L 的生理盐水。注入后用回形针夹住尿道口, 2 小时后松开尿道。造模结束后 3 h 恢复正常饮水和进食^[48-50]。

5.2.2.3 尿路感染模型的评判标准

采用反射排尿法于每次造模结束 24 h 后接取所有造模小鼠尿液，使用生理盐水 1: 100 稀释后，吸取 100 μ L，均匀涂抹在麦康凯琼脂六孔板。以尿液平板中 UPEC 数量 ≥ 10 CFU 为高滴定细菌尿作为造模成功的判定标准。将不符合标准的小鼠剔除，并计算造模成功率。

5.2.2.4 实验动物分组及给药

按等效剂量系数折算法换算给药剂量，将造模成功的小鼠随机分为模型对照组，阳性药左氧氟沙星组（给药剂量 60 mg/kg），买朱尼吾西拜低剂量组（给药剂量 450 mg/kg），买朱尼吾西拜中剂量组（给药剂量 900 mg/kg），买朱尼吾西拜高剂量组（给药剂量 1800 mg/kg），每组 10 只。小鼠按 0.2 mL/10 g 体重灌胃给药，连续给药 14 天，每日 1 次，空白组给予同容积的生理盐水。

5.2.2.5 尿路感染模型检测指标

5.2.2.5.1 体重检测

每天记录造模前后及给药期间小鼠体重，检测造模及给药对小鼠体重的影响。

5.2.2.5.2 形态学观察

观察实验期间各组别尿道口炎症形态情况，各组小鼠的死亡情况以及感染后小鼠的精神状态变化。并对尿道口及异常体征的小鼠进行拍照记录。

5.2.2.5.3 尿液细菌培养计数

在给药后第 1、3、6、9、12 天对每组三只小鼠（固定）取尿，第 14 天所有小鼠均取尿。记录小鼠编号。收集的尿液，吸取 20 μ L 后，用无菌生理盐水 1: 10 稀释后，吸取 100 μ L 后涂抹于麦康凯琼脂六孔板培养基上。涂板后静置 1 h 后置于 35℃培养箱内，孵育 24 h 后计算尿液菌落数。通过观察尿中排菌的情况来了解感染后细菌在尿中分布的变化规律。

5.2.2.6 泌尿系统 HE 染色

5.2.2.6.1 取样

小鼠脱颈处死后，取肾脏-输尿管-膀胱整套组织，每组取三只，放入 10%甲醛里保存。

5.2.2.6.2 病理组织切片及染色

膀胱、肾脏、输尿管等组织使用 10%甲醛固定后，切成合适大小组织块，依次进行乙醇脱水，二甲苯透明处理，浸蜡，包埋，切片，切片脱蜡，HE 染色，中性树胶封片。光学显微镜下观察小鼠膀胱、肾脏及输尿管的病理形态并进行拍照。

具体操作：将新鲜取材的组织置于 10%甲醛中固定 24 h 后进行脱水：75%无水乙醇 20 min-85%无水乙醇 20 min-95%无水乙醇I-10 min-95%无水乙醇II-10 min-100%无水乙醇乙醇 1-20 min；透明：二甲苯I-3 min-二甲苯II3 min；浸蜡：将处理后的组织置于石蜡中浸泡 2 h；包埋：将组织液用蜡块包埋制成蜡块，蜡块冷凝后放入-20℃冰箱，待石蜡全部凝固后取出晾干；切片：将蜡块切至 8 μm 厚度，粘附于载玻片上，然后置于烘箱 65℃烘片 3 h；脱蜡复水：二甲苯I10 min-二甲苯II5 min-100%无水乙醇-95%无水乙醇-85%无水乙醇-75%无水乙醇各 3 min，蒸馏水泡 5s；染色装片：苏木精染色液 2-3 min-水泡 1 min-分化液 60s-水泡 3-5 min-伊红染色 1 min-75%无水乙醇-85%无水乙醇-95%无水乙醇各 3 秒-100%无水乙醇 1 min-二甲苯I-二甲苯II各 1 min-中性树胶装片。

5.3 实验结果

5.3.1 体外抑菌 MIC 值及 MBC 值的测定

结果表明，买朱尼吾西拜粉末及单药材对大肠杆菌、铜绿假单胞菌、白色念球菌均有良好的抑制效果。其中全方以及处方中对铜绿假单胞菌的抑菌效果最好，全方，欧菝葜根，番泻叶，地锦草对铜绿假单胞菌的 MIC 值分别为 0.57，0.14，1.13，0.57 mg/mL，MBC 值均大于 9 mg/mL，说明该药抑菌效果显著，但不能杀灭细菌。

表 5-1 全方及单药材对三种尿道菌的 MIC 值

Table 5-1 MIC values of the whole formula and single herbs against three uropathogens				
	全方（mg/mL）	欧菝葜根（mg/mL）	番泻叶（mg/mL）	地锦草（mg/mL）
大肠杆菌	2.25	4.5	2.25	4.5
铜绿假单胞菌	0.57	0.14	1.13	0.57
白色念球菌	2.25	2.25	2.25	4.5

表 5-2 全方及单药材对三种尿道菌的 MBC 值

Table 5-2 MBC values of the whole formula and single herbs against three uropathogens				
	全方（mg/mL）	欧菝葜根（mg/mL）	番泻叶（mg/mL）	地锦草（mg/mL）
大肠杆菌	>9	>9	>9	>9
铜绿假单胞菌	>9	>9	>9	>9
白色念球菌	>9	>9	>9	>9

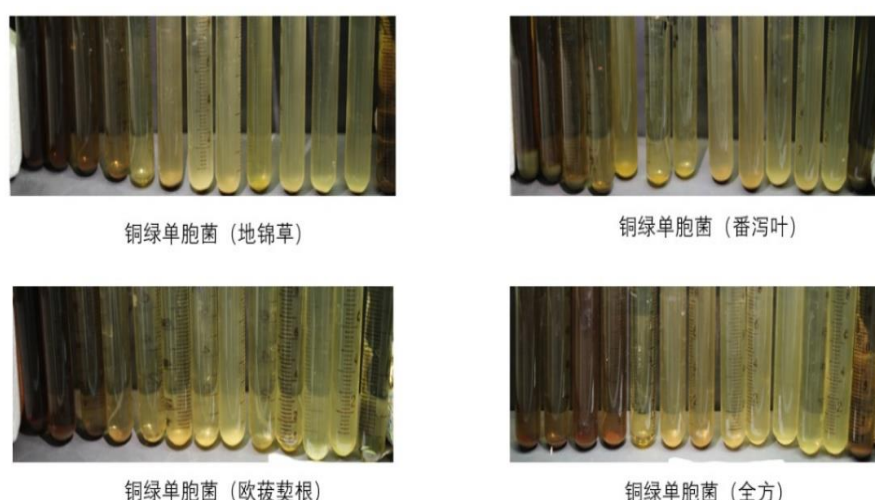


图 5-1 全方及单药材对铜绿单胞菌的 MIC 值测定

(试管 1-11 为药物组, 试管 12 为阳性对照, 试管 13 为阴性对照)

Figure 5-1 Determination of MIC values of whole formula and single herbs
against *P.aeruginosa*

(Tubes 1-11 are the drug group, tube 12 is the positive control and tube 13 is the negative control)

5.3.2 尿路感染 UTI 模型实验结果

5.3.2.1 各组小鼠一般情况

实验小鼠数量 90 只, 其中空白 10 只, 造模 80 只。但在两次造模中, 总共死亡 16 只小鼠, 解剖死亡小鼠后, 发现 10 只小鼠死于造模过程中刺穿尿道及脏器, 其余 6 只小鼠死于尿脓毒血症。将剩下的 64 只模型小鼠全部取尿进行尿液平板涂板, 发现 51 只小鼠尿液培养计数后, 大肠杆菌数量 >10 CFU, 成功感染。去除一只残疾小鼠, 剩余的 50 只小鼠随机分为模型组、低中高剂量组、阳性组, 每组 10 只。连续给药 14 天后发现, 空白组小鼠精神状态良好, 饮食正常, 活动情况正常, 尿道口无红肿。模型组小鼠表现为活动减少, 精神萎靡, 体重增长不明显并且尿道口红肿。各治疗组小鼠的反应、精神、饮食、活动等较模型组有所改善, 中、高剂量及阳性药组改善明显。

5.3.2.2 买朱尼吾西拜对小鼠体重的影响

小鼠体重情况见表 5-3, 造模前各组小鼠无显著性差异 ($P>0.05$)。造模后, 与正常组小鼠相比, 造模组的小鼠体重较正常组减轻。给药 14 天后, 与模型组小鼠相比, 正常组、阳性组、买朱尼吾西拜高中低剂量组体重增长都较模型组有明显提高, 有显著性差异 ($P<0.05$)。

表 5-3 造模及买朱尼吾西拜对小鼠体重的影响 (x̄±s)

Table 5-3 Effect of modeling and maizhuniwuxibai on body weight in mice

组别	造模后体重 (g)	给药 14 天后体重 (g)
正常组	19.20±0.64	19.66±0.63
模型组	17.45±0.64	17.85±0.63
阳性药组	17.76±0.42	18.96±0.49
低剂量组	17.82±0.43	18.90±0.70
中剂量组	17.50±0.51	18.63±0.82
高剂量组	17.42±0.68	18.81±0.80

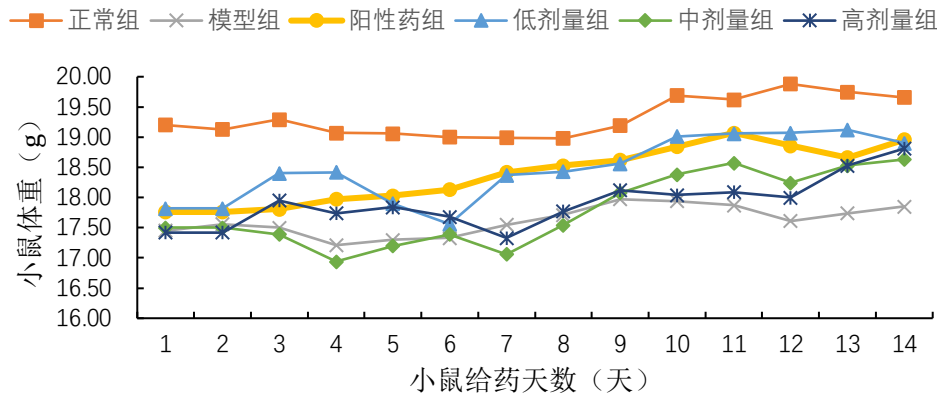


图 5-2 买朱尼吾西拜对小鼠 UTI 模型体重的影响

Figure 5-2 Effect of buyjunigosibai on body weight in a mouse UTI model

5.3.2.3 给药后各组尿液细菌培养计数情况

共计给药 14 天。在第 1、3、6、9、12、14 天，进行涂板观察。收集每组三只小鼠的尿液，稀释后在麦康凯琼脂平板上培养并计数（两个平行，上下两孔为一个样本），结果：给药 6 天后，阳性药组左氧氟沙星尿液培养无细菌，给药 12 天后，买朱尼吾西拜高剂量组尿液培养无细菌。其余药物治疗组细菌量逐渐减少，平板计数情况见图 5-及表 5-4。

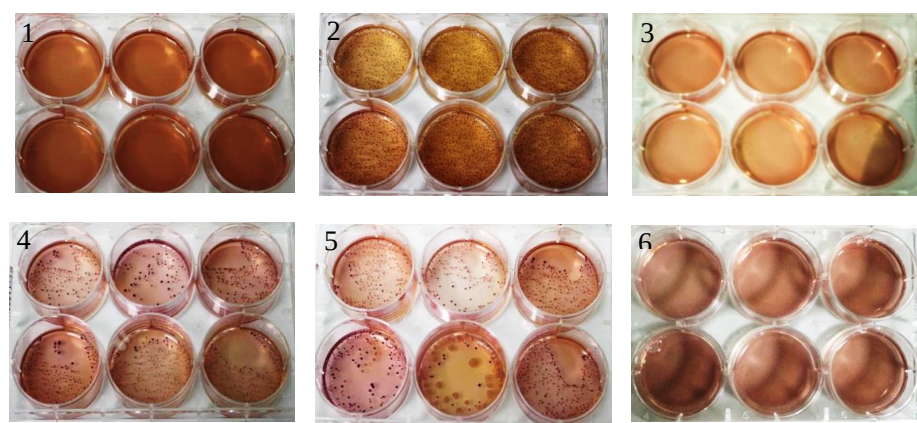


图 5-3 给药 14 天后各组尿液涂板情况

Figure 5-3 Urine coated plates in each group after 6 days of drug administration

注：1. 正常组；2.模型组；3.阳性药组；4.低剂量组；5.中剂量组；6.高剂量组

Note: 1. Normal group; 2. Model group; 3. Positive drug group;
4. Low-dose group; 5. Medium-dose group; 6. High-dose group

表 5-4 平板涂布计数

Table 5-4 Flat Plate Coating

组别	给药 1 天后 (cfu)	给药 3 天后 (cfu)	给药 6 天后 (cfu)	给药 9 天后 (cfu)	给药 12 天后 (cfu)	给药 14 天后 (cfu)
正常组 1	0	0	0	0	0	0
正常组 2	0	0	0	0	0	0
正常组 3	0	0	0	0	0	0
模型组 1	>200	>200	>200	>200	>200	>200
模型组 2	>200	>200	>200	>200	>200	>200
模型组 3	>200	>200	>200	>200	>200	>200
阳性药组 1	>200	>200	0	0	0	0
阳性药组 2	>200	186	0	0	0	0
阳性药组 3	>200	142	0	0	0	0
低剂量组 1	>200	>200	>200	>200	142	2
低剂量组 2	>200	>200	>200	185	156	24
低剂量组 3	>200	>200	>200	168	128	30
中剂量组 1	>200	>200	196	28	1	0
中剂量组 2	>200	>200	186	24	1	0
中剂量组 3	>200	>200	>200	15	2	0
高剂量组 1	>200	166	106	0	0	0
高剂量组 2	>200	185	114	0	0	0
高剂量组 3	>200	>200	128	0	0	0

5.3.2.4 HE 染色

空白组的膀胱组织结构未见明显破坏，膀胱上皮细胞完整，层数完好；膀胱粘膜下层均未见明显炎性细胞浸润。模型组的膀胱组织上皮明显坏死脱落、粘膜下层可见大量炎症细胞浸润。阳性药组膀胱上皮组织排列整齐，层数完好，膀胱粘膜下层未见明显的炎症细胞浸润。其中药物干预组比较，买朱尼吾西拜高剂量组的肾脏及膀胱组织的 HE 染色结果最为接近空白组。

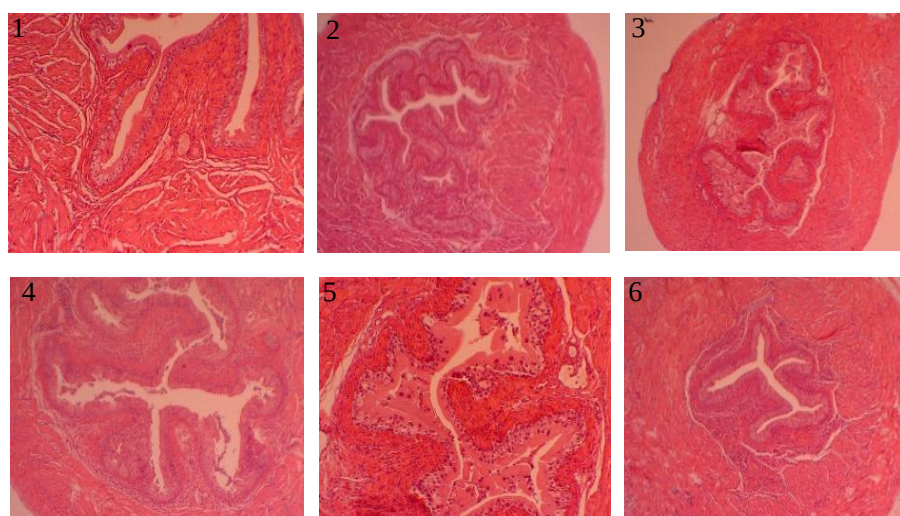


图 5-4 小鼠膀胱染色情况 (40×)

Figure 5-4 Staining of the bladder in mice (40×)

注：1. 正常组；2.模型组；3.阳性药组；4.低剂量组；5.中剂量组；6.高剂量组

Note: 1. Normal group; 2. Model group; 3. Positive drug group;

4. Low-dose group; 5. Medium-dose group; 6. High-dose group

5.4 讨论与分析

本实验对体外三种常见尿道菌进行了抑菌能力检测，其中对铜绿假单胞菌的抑制作用最明显。铜绿假单胞菌具有易定植、易变异和易耐药的特点，可导致皮肤软组织、尿路、肺、腹腔、血液、中枢神经系统等部位感染。并且能够形成滞留菌，抵抗多种目前可用的抗生素，产生耐药性，而买朱尼吾西拜作为经典名方，不易产生耐药性，具有清热通淋等功效，未来可发展成为治疗铜绿假单胞菌的药物^[51-52]。

本实验建立了 UTI 尿路感染动物模型，从小鼠一般情况到尿液涂板计数及病理结果，均显示买朱尼吾西拜对大肠埃希菌有较好的抗菌作用。本研究中模型组病理切片中见大量的炎症细胞浸润及膀胱上皮细胞坏死、脱落等改变。而买朱尼吾西拜组细菌

计数明显减少，高剂量组病理未见明显炎症细胞浸润，无膀胱上皮细胞坏死、脱落等改变。说明买朱尼吾西拜能减轻小鼠的尿路炎症反应，具有治疗尿路感染的作用。买朱尼吾西拜对尿路感染抗菌效果显著，然而免疫调节通路上的具体调节作用及对细菌被膜的影响及其机制等有待进一步验证。

第6章 总结

药材研究方面, 本文对诃子、毛诃子、地锦草、番泻叶等药材进行质量检查与提升, 其中 2 批毛诃子, 2 批诃子性状外观不合格, 2 批地锦草灰分不合格, 1 批余甘子含量不合格。对缺少薄层鉴别项的药材, 进行薄层方法质量提升。依据标准要求对含量检查项的 4 味药材进行含量测定, 并对无标准要求的诃子、毛诃子新建 HPLC 检测方法并进行方法学验证, 诃子提升成分为诃黎勒酸, 鞣花酸、毛诃子提升成分为没食子酸、安石榴苷、鞣花酸。并进行三批次的验证。按处方要求对毛诃子进行清炒工艺, 最终确定文火炒制 30 min 时, 色度值, 三种鞣质类成分含量最高, 总皂苷含量变化趋于平缓。并建立了十批次的炮制品质量标准。物质基准样品研究方面, 实验根据药材粉碎特性、各药材入药部位不同、粉碎时间、出粉率以及休止角, 通过单独粉碎、混合粉碎确定粉碎工艺为全药材粉碎, 同时考察不同混合次数对中间体粉末均一性的影响, 确定混合工艺为过筛 10 次; 综合评定确定最佳工艺为使用铁船, 1/6 处方倍量全药材粉碎并混合 10 次。并进行了十批次的物质基准样品研究。药效学研究方面, 进行了全方及单药材对三种常见尿道感染的 MIC 值测定, 抑菌效果明显, 对尿路感染 UTI 模型小鼠疗效显著, 同时也为为买朱尼吾西拜后续制剂工艺提供参考。

本课题还有待完善, 后续将进行其它药材的含量测定质量提升; 如欧菝葜根中的落新妇苷, 盒果藤根中的羽扇豆醇。工艺方面, 进行蜜膏剂成品的制备。在药效方面, 将开展细胞实验以及 WB 蛋白组学研究, 以期开发成为一款特色的治疗尿路感染的中药民族药。

参考文献

- [1]顾思浩,张薇,王冰,等. 经典名方苓桂术甘汤历史沿革[J]. 中国医药导报, 2020, 17 (21): 145-148.
- [2]翟艳敏. 经典名方现代研发关键技术[D]. 江苏: 江苏大学, 2021.
- [3]刘艳, 章军, 杨林勇, 等. 经典名方物质基准研制策略及关键问题分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26 (01): 1-9.
- [4]陈畅, 程锦堂, 刘安. 经典名方研发策略[J]. 中国中药杂志, 2017, 42 (09): 1814-1818.
- [5]张鹏, 刘安, 鄢兰, 等. 经典名方概述与开发探讨[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26 (15): 183-194.
- [6]周菲, 林美斯, 王琳, 等. 经典名方百合地黄汤物质基准制备及过程质量控制研究[J]. 中草药, 2019, 50 (16): 3824-3832.
- [7]高乐, 杨梦婷, 冯玉, 等. 经典名方旋覆代赭汤物质基准的质量研究[J]. 中药材, 2022 (05): 1178-1184.
- [8]陈士林, 刘昌孝, 张铁军, 等. 基于中药质量标志物和传统用法的中药饮片标准汤剂传承发展研究思路与建议[J]. 中草药, 2019, 50 (19): 4519-4528.
- [9]王饶琼, 杨思进, 谢春光, 等. 清肺排毒汤治疗新型冠状病毒肺炎的临床疗效观察[J]. 中药药理与临床, 2020, 36 (01): 13-18.
- [10]王檀, 仕丽, 陈亦洋, 等. 新型冠状病毒肺炎 50 例中医临床疗效分析[J]. 吉林中医药, 2020, 40 (03): 281-285.
- [11]赵永旺, 柏莹, 刘峥嵘, 等. 日本汉方医药学发展历程对我国中医药学发展的启示[J]. 湖南中医药大学学报, 2018, 38 (05): 601-604.
- [12]赵建, 张俊博. 浅论中医学与日本汉方医学[J]. 内蒙古中医药, 2012, 31 (15): 121.
- [13]于翠婷, 田侃, 住田尚之, 等. 日本汉方制剂的发展现状及其经验启示[J]. 中草药, 2018, 49 (02): 494-498.
- [14]肖月园, 杨志波. 日本汉方医学发展带来的启示[J]. 中国中西医结合皮肤性病学杂志, 2018, 17 (06): 554-558.
- [15]赵晓晖, 马维骐. 日本汉方腹诊发展概况[J]. 国医论坛, 2018, 33 (05): 14-16.
- [16]王欢, 朱莹. 经方在中国传统医学和日本汉方医学的应用现状[J]. 中草药, 2019, 50 (15): 3714-3719.
- [17]杨平, 林丹, 宋菊, 等. 日本汉方制剂及其特点与中药新药研究的思考[J]. 中草药, 2018, 49 (09): 1985-1989.
- [18]高树葳, 邱智东, 赵燕, 等. 基于古代经典名方的中药新产品研究进展[J]. 长春中医药大学学报, 2021, 37 (03): 674-677.

- [19]艾买提江·阿衣甫别克, 买买提·努尔艾合买提, 买买提江·阿布都瓦克. 维药“祖发”的本草考证[J]. 中国民族民间医药, 2021, 30 (16): 29-35.
- [20]孙嘉磊, 阿依佐合热, 王海生, 等. 新疆维吾尔自治区常用维药、药源植物调查[J]. 时珍国医国药, 2018, 29 (08): 1980-1982.
- [21]毛鑫, 姚荣妹, 徐玉辉, 等. 急性尿路感染大鼠模型的建立及在中药药效评价中的应用[J]. 中药药理与临床, 2019, 35 (03): 177-180.
- [22]赵秋华, 刘秀蜀, 林乐欣. 阿莫西林克拉维酸钾治疗小儿尿路感染的临床效果[J]. 中国当代医药, 2019, 26 (05): 120-122.
- [23]余明主, 郑慧杰, 曹卫霞, 等. 银花泌炎灵片联合左氧氟沙星治疗急性尿路感染的临床观察[J]. 中国医师杂志, 2019, 21 (10): 1571-1574.
- [24]陈小丽, 白燕. 中医药治疗淋证的临床研究进展[J]. 内蒙古医学杂志, 2022, 54 (04): 460-462.
- [25]胡献国. 淋病的中医治疗[J]. 家庭医学, 2021 (01): 54.
- [26]赵俐超, 赵菁莉. 黄文政治疗下尿路感染经验[J]. 湖南中医杂志, 2021, 37 (09): 36-38.
- [27]郭秀英. 尿路感染的病因、发病机理与治疗[J]. 基层医学论坛, 2006 (12): 560-561.
- [28]王立平. 扶正清热利湿方治疗泛耐药大肠埃希氏菌尿路感染小鼠模型实验研究[D]. 重庆: 西南大学, 2013.
- [29]陈文静, 梁文仪, 李师, 等. 基于 HPLC-MSⁿ 和化学计量学的指纹图谱在毛诃子鞣质部位质量评价中的应用 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2017, 19 (7): 1228- 1233.
- [30]崔雨, 董婉绒, 刘恬恬等. 毛诃子化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中国现代中药, 2023, 25 (01): 216-226.
- [31]邓星, 罗莉娅, 苟立平等. 藏药毛诃子的质量标准提高研究 [J]. 中南药学, 2018, 16 (01): 117-120.
- [32]艾莉, 陈君程, 张继良等. 基于色彩色差计的川楝子炮制前后含量和颜色变化 [J]. 成都中医药大学学报, 2011, 34 (04): 81-83.
- [33]盛洁静, 杨硕. 大黄炮制前后体外抗菌活性比较 [J]. 哈尔滨商业大学学报 (自然科学版), 2019, 35 (06): 643-644+650.
- [34]周坤, 简平, 梁文仪等. 基于 UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS 分析藏药诃子与毛诃子化学成分 [J]. 质谱学报, 2020, 41 (03): 254-267.
- [35]李雪冬, 罗晓敏, 马箐等. 毛诃子化学成分和药理作用的研究进展及其质量标志物 (Q-Marker) 预测分析 [J]. 中草药, 2023, 54 (03): 976-990.
- [36]李师. 藏药毛诃子化学成分及体外抗癌活性的研究[D]. 北京中医药大学, 2018.
- [37]董宇, 姜鑫, 刘静等. 分光光度法测定宁神颗粒中总皂苷含量 [J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9 (19): 5208-5211.
- [38]欧亮苗, 阿来·赛坎, 李柯翱等. HPLC 法同时测定维药没食子中没食子酸、没食子酸甲

- 酯和鞣花酸的含量 [J]. 国际药学研究杂志, 2015, 42 (05) : 637-641.
- [39]黄宽,付鹏,林艾和等. HPLC 法同时测定毛诃子中 5 种鞣质类成分的含量 [J]. 中国药师, 2021, 24 (03) : 607-609.
- [40]陈文静,梁文仪,李师等. 基于指纹图谱分析和多成分同时定量的藏药毛诃子质量评价研究 [J]. 中草药, 2017, 48 (06) : 1210-1215.
- [41]李秀宇,马芹. 水龙骨中没食子酸与鞣花酸的含量测定 [J]. 化学研究, 2023, 34 (01) : 14-19.
- [42]Yadava R N. A new cardenolide from the seeds of *Terminalia bellerica* [J]. *Fitoterapia*, 2001, 72 (3) : 310-312.
- [43]王舒. 药用植物毛诃子研究进展 [J]. 安徽农业科学, 2015, 43 (05) : 65-66.
- [44]喻文丽,李佩琪,秦新政等. 不同粉碎工艺对天山雪耳营养成分溶出率及化学成分的影响 [J]. 食品与发酵工业, 2020, 46 (18) : 122-127.
- [45]胡慧芬. 姜厚朴均匀化饮片的工艺研究[D]. 湖北: 湖北中医药大学, 2015.
- [46]蛋鸡饲料的最佳粉碎粒度 [J]. 家禽科学, 2018, (09) : 7.
- [47]王红英,陈计远,金楠等. 饲料粉碎工艺高效利用技术研究 [J]. 饲料工业, 2020, 41 (13) : 1-8.
- [48]钟禹文.“扶正清热通淋”汤通过调节 NLRP3 炎症小体通路对大鼠复杂性尿路感染作用的研究[D]. 四川: 西南医科大学, 2022.
- [49]贺天文. 新型大鼠尿路感染模型的建立与中药方剂对产 ESBLs 大肠埃希菌致大鼠复杂性尿路感染作用的研究[D]. 四川: 西南医科大学, 2019.
- [50]石明. 小鼠急性细菌性膀胱炎模型的建立及透明质酸钠膀胱灌注治疗小鼠膀胱炎的实验研究[D]. 湖北: 华中科技大学, 2013.
- [51]杜婉迎. 含色氨酸抗菌肽对铜绿假单胞菌滞留菌的作用研究[D]. 辽宁: 辽宁师范大学, 2022.
- [52]苏佳纯,杨帆. 头孢他啶-阿维巴坦在铜绿假单胞菌感染中的应用价值 [J]. 中国感染与化疗杂志, 2023, 23 (02) : 237-242.

致谢

三月，拾花酿春，微风细雨，我们在石大相遇。六月，流萤染夏，阳光正盛，我们低诉离别。行文至此，言之将近。七载求学，三年研路，终抵不过时光飞逝，太匆匆，时光里有年少的不羁与懵懂，有青春的颓废与迷茫，也有成熟之后的稳重与幸福。求学本来就是一场旅行，纵有千种不舍，我们终究会经历相遇与离别，终将结束一路跌跌撞撞的学生时代，去拥抱更美好的未来。

郡才智平庸，学识浅薄，书以微词，以表我心。

致学院：

明德正行，博学多能。笃学创新，精药济世。幸得石大栽培，良师教诲，传道授业。所遇之人，亦师亦友，由是感激。良辰美景，师友携行。药院长廊，刻苦钻研，终不能忘。愿学院发展蒸蒸日上，永创辉煌。在此，感谢药学院给我们提高了学习以及科研的平台。感谢唐辉院长把我们药学院建设的人才济济，欣欣向荣。也感谢学校里如朱芸、刘雯霞等博学多才的老师对学生们的悉心指导。祝愿会有更多的青年才俊加入到我们药学院，希望药学院永创辉煌。

致培养单位：

华夏仁医良药，世人健康福祉，丹心可见致远。阿胶强骨火遍大江南北。华药研人，携手共进，奉献我们的青春和热情，发挥我们的智慧与能量。奋斗执着，勤勉严谨。再谱我们华药研的崭新篇章。在此，感谢培养单位新疆华世丹药物研究有限责任公司对我的实验课题提供了强有力的支撑。感谢我亦师亦母的马芹老师以及认真负责的陈伟老师，对我在生活上与研究上无微不至的照顾。同时也感谢恩师们两年半对我所犯错误的包容。在此我由衷的对两位老师说一句“抱歉和谢谢”。同时也感谢单位的小伙伴们比如我的师姐王楠，孟丽燕，刘利以及师弟师妹们对我的照顾。愿恩师马芹老师永葆青春容颜与天籁之音，老师们和师姐们项目申报必过，研究进展取得重大突破，师弟师妹们学业有成，前程似锦。

致父母：

十月胎恩重，三生报答轻。求学七载，陪伴甚少，多年未见，未曾想父母须发皆有斑白。羊有跪乳之恩，乌鸦有反哺之义，身为人子，离家求学，未尽孝道。深表歉意。在此，感谢父母对我的养育之恩，经济以及精神上的支撑。他们很平凡，手上满是老茧以及岁月的痕迹，他们没有较高的文化水平，在求学路上好像给不了我什么帮助，但是却给了我我能给我的一切。给不了我太多的建议，却永远的支持我的选择。他们是我坚定向前的动力，我失落时的避风港。待我归来，带父母游遍祖国的好山好水，

让她们享受天伦之乐。

致朋友：

金风玉露一相逢，便胜却人间无数。世人千千万，你我相遇相识，缘分尽在不言中。曾经一起分享着快乐，也一起倾诉着痛苦。彼此牵挂，一起成长。可能分别后再也见不到了，可能偶尔想起彼此也才会联系。但我们的青春里都留下了彼此的影子，那就足够了。于君各努力，千里自同风。

在此，感谢我的实习室友高佳睿，共度晚宴，结伴旅行。感谢我的本科好朋友何长明、徐其飞，我们一起度过了人生中一段快乐的时光。感谢从小到大陪伴我一起成长的好朋友金玉涛和赵英博，彼此关心照顾。最后感谢一下我的女朋友李天骄同学。愿有岁月可回首，且以深情共白头。

忆往昔，悲喜交加。泪如泉涌，情寄于谢辞。郡三尺微命，一介愚生，幸得学院恩师之提携，亲友之相助。方能文成事毕。为人笨拙，多有过错。感念众人不离不弃，深表歉意，由是感激。愿终能乘风破浪，不改初志，刻苦学习。三载寒暑。无论喜悦还是酸楚，所有经历，于我都是礼物；所有相遇，于我都是宝藏。天高海阔，万事胜意。山水有来路，早晚复相逢。

作者简介

李剑郡，男性，生于 1999 年 12 月，籍贯辽宁。2021 年毕业于石河子大学药学院药学专业，获理学学士学位。2021 年 9 月起以专业型硕士研究生的身份，就读于石河子大学药学院药学专业，研究方向为新疆植物药特色资源与利用。实习实践单位为新疆华世丹药物研究有限责任公司，主要从事内容为药材质量检查及质量提升、药理研究等。

在学期间主要参与的研究项目

- 1.参加了师市科技攻关计划项目“经典名方买朱尼吾西拜的物质基准研究”（编号 2023GG2501）的研究工作。
- 2.参加了自治区重点研发专项“古代经典名方复方制剂的关键技术研究”（编号 202GG2501）的研究工作。

获奖情况

2021 学年-2022 学年：石河子大学三等学业奖学金

石河子大学硕士研究生学位论文导师评阅表

研究生姓名	李剑郡	学制	3 年制
专业	药学	研究方向	新疆植物药特色资源与利用

学术评语:

该硕士学位论文主要研究了买朱尼吾西拜的“物质基准”，药材研究方面包括对药材依据标准进行质量检查及提升；毛诃子炮制及 10 批次质量标准研究；工艺研究包括对药材进行粉碎工艺与混合工艺研究，考察十位药材粉碎特性、单独粉碎、部分粉碎、全药材粉碎出粉率与粉碎时间，不同混合次数对粉末均匀度的影响，确定物质基准样品工艺；药效学研究包括体外抑菌能力检测与尿路感染动物实验，使用试管二倍稀释法进行买朱尼吾西拜全方及欧菝葜根、地锦草、番泻叶的 MIC 值测定。开展买朱尼吾西拜 UTI 尿路感染动物实验，进行体重监测，行为学观察，HE 染色，综合评价买朱尼吾西拜对尿路感染的抗菌效果。为买朱尼吾西拜临床上市提供依据，以期开发一款具有中药民族药特色的主治尿路感染的经典名方。

该论文选题来源于实际，系所属专业学位类别的研究范畴，有明确的现实研究背景；文献资料丰富，归纳总结的条理性较清晰；论文的论点明确，论据翔实，论证严密，结构合理，逻辑性强，表达准确，写作规范，引文规范，学风较为严谨，论文已按照要求格式进行修改，同意该研究生参加答辩。

指导教师签字:



2024 年 5 月 15 日