

- 湿法机理的探讨[J]. 中国中医药科技, 1999, 6(2): 65-67.
- [3] Candiano G, Bruschi M, Musante L, et al. Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis[J]. Electrophoresis, 2004, 25(9): 1327-1333.
- [4] 王常松, 傅晓晴, 刘清华, 等. 中医证蛋白质组学研究探析[J]. 中华中医药杂志, 2011, 26(3): 535-537.
- [5] 王新贤, 殷海波, 姜泉, 等. 蛋白质组学在中医证候学研究中的应用进展[J]. 世界中医药, 2017, 12(8): 1965-1969.
- [6] 袁宏伟, 杜武勋, 朱明丹, 等. 冠心病心气虚弱证/心肾阴虚证血清蛋白质组学特征研究[J]. 时珍国医国药, 2012, 23(4): 1014-1016.
- [7] 孟庆宏, 王常松, 傅晓晴, 等. 蛋白质组学技术引入中医证理论的可行性研究[J]. 中医学报, 2011, 26(2): 170-172.
- [8] 杨春波, 黄可成, 肖可成, 等. 脾胃湿热证的临床研究-400例资料分析[J]. 中医杂志, 1994, 35(7): 425-427.
- [9] 尹思源, 张光华, 张磊, 等. 慢性胃脘痛证候分布规律的调查(附115例典型病例分析)[J]. 泸州医学院学报, 1995, 18(2): 109-111.
- [10] 周正, 黄志新, 劳绍贤. 脾胃湿热证的现代研究进展[J]. 湖南中医药导报, 2003, 9(6): 65-67.
- [11] Choi-Miura NH, Takahashi K, Yoda M, et al. The novel acute phase protein, IHRP, inhibits actin polymerization and phagocytosis of polymorphonuclear cells[J]. Inflamm Res, 2000, 49(6): 305-310.
- [12] Venugopal SK, Devaraj S, Jialal I. Effect of C reactive protein on vascular cell: evidence for a proinflammatory, proatherogenic role[J]. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2005, 14(1): 33-37.
- [13] 曹代娣. 胃脘痛的宏观辨证与微观结合的初步探讨[J]. 辽宁中医杂志, 1994, 21(2): 54-55.
- [14] 郑家铿, 张群豪, 许少锋, 等. 慢性胃病脾胃湿热证与脾气虚证的血液流变学观察[J]. 福建中医学院学报, 1994, 4(2): 6-8.
- [15] 侯冬梅, 刘勤社, 郭安阳. 慢性萎缩性胃炎中医证型与血液流变学的关系[J]. 中国中西医结合脾胃杂志, 1997, 5(1): 14-16.
- (责任编辑: 冯天保, 郑锋玲)

## 不同工艺冰荷洗剂药理实验研究

欧少福<sup>1</sup>, 刘瑞连<sup>2</sup>, 首弟武<sup>2</sup>

1. 张家界市中医医院, 湖南 张家界 427000; 2. 湖南省中医药研究院, 湖南 长沙 410005

**[摘要]** 目的: 采用抗炎与致敏实验优选冰荷洗剂的制备工艺。方法: 选用相同的药材采用不同的提取工艺分别制备冰荷洗剂。采用二甲苯致小鼠耳肿胀法及外涂2, 4-二硝基氯苯致豚鼠皮肤致敏实验筛选冰荷洗剂的最佳制备工艺。结果: 与空白对照组比较, 冰荷洗剂水提组、冰荷洗剂醇提组、冰荷洗剂部分水提部分醇提组及冰荷洗剂挥发油组小鼠耳肿胀度均显著降低, 耳肿胀抑制率显著升高, 差异均具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。模型组的致敏率为100%, 而冰荷洗剂水提组、冰荷洗剂醇提组、冰荷洗剂部分水提部分醇提组及冰荷洗剂挥发油组豚鼠致敏率均为0。与空白对照组比较, 模型组豚鼠致敏率较高, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。与模型组比较, 冰荷洗剂水提组、冰荷洗剂醇提组、冰荷洗剂部分水提部分醇提组及冰荷洗剂挥发油组豚鼠致敏率较低, 差异均具有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。结论: 提取挥发油工艺为冰荷洗剂最佳制备工艺。

**[关键词]** 冰荷洗剂; 抗炎作用; 致敏实验; 制备工艺; 动物实验; 小鼠; 豚鼠

**[中图分类号]** R-332 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0256-7415 (2018) 07-0018-04

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2018.07.006

### Pharmacological Experiment Study of Binghe Lotion Under Different Technologies

OU Shaofu, LIU Ruilian, SHOU Diwu

**Abstract:** Objective: To optimize the preparation technology of Binghe lotion by anti-inflammatory and sensitization tests.

**[收稿日期]** 2018-03-19

**[基金项目]** 湖南省中医药科研计划项目 (201875)

**[作者简介]** 欧少福 (1973-), 男, 主任医师, 主要从事中医内科及药理研究。

**[通信作者]** 首弟武, E-mail: shyyx9228@sohu.com.

**Methods:** Selected the same medicinal materials but adopted different extraction technologies to prepare Binghe lotion. Used the method of ear edema in mice induced by xylene, and skin sensitization test in guinea pigs induced by the external application of 2, 4-dinitrochlorobenzene to screen the optimal preparation technology of Binghe lotion. **Results:** Comparing with the blank control group, the degree of ear edema of mice in the group of Binghe lotion by water extraction, the group of Binghe lotion by alcohol extraction, the group of Binghe lotion partly by water extraction and alcohol extraction and the group of Binghe lotion by volatile oil extraction was significantly decreased respectively, and the inhibition rate of ear edema was significantly increased, differences being significant ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). The sensitization rate was 100% in the model group, while the sensitization rate was 0 in the group of Binghe lotion by water extraction, the group of Binghe lotion by alcohol extraction, the group of Binghe lotion partly by water extraction and alcohol extraction and the group of Binghe lotion by volatile oil extraction. Comparing with the blank control group, the sensitization rate of guinea pigs in the model group was relatively higher, difference being significant ( $P < 0.01$ ). Comparing with the model group, the sensitization rate of guinea pigs was relatively lower in the group of Binghe lotion by water extraction, the group of Binghe lotion by alcohol extraction, the group of Binghe lotion partly by water extraction and alcohol extraction and the group of Binghe lotion by volatile oil extraction, differences being significant ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** Volatile oil extraction is the optimal preparation technology of Binghe lotion.

**Keywords:** Binghe lotion; Anti-inflammatory effect; Sensitization test; Preparation technology optimization; Animal experiment; Mice; Guinea pigs

冰荷洗剂是治疗龟头炎的经验方,主要由苦参、黄柏、土茯苓、茵陈、龙胆、白藓皮、冰片、薄荷等组成,具有清热利湿、芳香化浊、杀虫止痒等功效<sup>[1]</sup>。冰荷洗剂外用治疗龟头炎疗效高,使用方便、经济,总有效率达到90%,且无严重不良反应<sup>[2-4]</sup>。由于龟头炎危害生殖系统健康,引发泌尿系统疾病,导致性功能障碍,造成不育症等,故研究开发出治疗该病的有效药物迫在眉睫。为了将该经验方制成一个工艺先进、制剂稳定、疗效确切的中成药,在前期以化学成分为指标优选工艺的基础上,以主要药效作用和致敏性为评价指标,优选冰荷洗剂的制备工艺。本实验对不同工艺制备的冰荷洗剂进行了小鼠耳肿胀模型的抗炎作用及对豚鼠致敏性的比较,为确定最佳工艺提供更为确切的实验依据。

## 1 材料

**1.1 实验动物** ICR小鼠50只,SPF级,体质量18~22g,雌雄各半,由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供,实验动物合格证号:43004800035762。白色豚鼠60只,SPF级,体质量250~300g,雌雄各半,由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供,实验动物合格证号:43004800036321。

**1.2 实验药物** 冰荷洗液:各工艺组由湖南中医药大学提供,具体制备工艺如下:①冰荷洗剂水提组:按处方称取花椒、薄荷、茵陈、龙胆草、苦参、黄柏、白鲜皮、土茯苓、青蒿等饮片加7倍量水浸泡0.5h后,先武火煮沸,再文火煮沸1h,滤过,收集滤液,药渣再加5倍量水煮沸40min,滤过,合并滤液,适当浓缩;冰片细粉用5%无水乙醇溶解,加入浓缩液中,调整至每1mL药液相当于1g生药量,即得。②冰荷洗剂醇提组:称取各药物用60%乙醇回流提取,回收醇,溶媒用量、提取时间与药液浓度同上。③部分水提部分醇提

组:薄荷、花椒、龙胆草、茵陈同①水提,浓缩,备用;苦参、黄柏、白鲜皮、土茯苓、青蒿同②醇提;水提与醇提浓缩液合并,同上加冰片,即得。④提挥发油组:按处方称取薄荷、花椒加8倍量水浸泡0.5h后提取挥发油至油不再增加为止,收集挥发油,滤出药液,药渣均备用;其他药物同③提取、制备药液。

**1.3 试剂与仪器** 二甲苯(天津市富宇精细化工有限公司,批号:20130528);2,4-二硝基氯苯(北京西亚化学股份有限公司,批号:w5656)。AB204型电子天平(瑞士梅特勒),耳打孔器(深圳瑞沃德)。

## 2 方法

**2.1 二甲苯致小鼠耳廓肿胀实验<sup>[5-7]</sup>** 取ICR小鼠50只,雌雄各半,用8%硫化钠脱去脊柱两侧毛,每侧面积2cm×2cm。24h后将小鼠随机分为5组:空白对照组、冰荷洗剂水提组、冰荷洗剂醇提组、冰荷洗剂部分水提部分醇提组、冰荷洗剂提挥发油组,每组10只,每天每只小鼠脱毛区涂药1次,连续7天,空白对照组给予等体积蒸馏水。末次涂药后30min,给小鼠右耳两面涂以二甲苯0.02mL/只,15min后处死动物,用8mm打孔器将小鼠双耳等面积切下,用AB204型电子天平分别称重,以左右二耳片重量差值作为肿胀度指标,并计算抑制率。抑制率=[(右耳重量-左耳重量)/左耳重量]×100%。

**2.2 皮肤致敏实验<sup>[8]</sup>** 取豚鼠60只,雌雄各半,用8%硫化钠将豚鼠脊柱两侧毛脱掉,每侧面积3cm×3cm。24h后将豚鼠随机分为6组:空白对照组、模型组、冰荷洗剂水提组、冰荷洗剂醇提组、冰荷洗剂部分水提部分醇提组、冰荷洗剂提挥发油组,每组10只。分别取冰荷洗剂水提物、冰荷洗剂醇提物、冰荷洗剂部分水提部分醇提物、冰荷洗剂提挥发油

0.2 mL 涂在相应组别动物左侧脱毛区，用一层油纸和二层纱布覆盖，再以无刺激性胶布封闭、固定，持续 6 h，第 7 天和第 14 天以同样方法各重复 1 次。空白对照组涂蒸馏水，模型组涂 1% 2, 4- 二硝基氯苯。于末次给冰荷洗剂水提物、冰荷洗剂醇提物、冰荷洗剂部分水提部分醇提物、冰荷洗剂挥发油致敏后 14 天，涂 1% 2, 4- 二硝基氯苯，6 h 后去掉受试物，即刻观察，然后于 24、48、72 h 再次观察皮肤过敏反应情况，按表 1 记录各时间过敏反应分值，并计算动物致敏发生率。致敏发生率 = 出现过敏反应的动物数 / 受试动物总数 × 100%。致敏发生率 1% ~ 10%，提示药物无致敏性；致敏发生率 11% ~ 30%，提示药物有轻度致敏性；31% ~ 60%，提示药物有中度致敏性；61% ~ 80%，提示药物有重度致敏性；81% ~ 100%，提示药物有极度致敏性。

表 1 皮肤过敏反应程度的评分标准

皮肤过敏反应情况	分值
红斑	
无红斑	0
轻度红斑，勉强可见	1
中度红斑，明显可见	2
重度红斑	3
紫红色红斑并有焦痂形成	4
水肿	
无水肿	0
轻度水肿，勉强可见	1
中度水肿，明显可见	2
重度水肿，皮肤隆起 1 mm，轮廓清楚	3
严重水肿，皮肤隆起 1 mm 以上	4
最高总分值	8

2.3 统计学方法 采用 SPSS23.0 进行统计学分析。计量资料以( $\bar{x} \pm s$ )表示，满足正态性与方差齐性，采用单因素方差分析，不满足正态性与方差齐性，采用非参数法检验。计数资料采用 $\chi^2$ 检验。

3 结果

3.1 各组小鼠耳廓二甲苯致炎结果比较 见表 2。与空白对照组比较，冰荷洗剂水提组、冰荷洗剂醇提组、冰荷洗剂部分水提部分醇提组及冰荷洗剂挥发油组小鼠耳肿胀度均显著降低，耳肿胀抑制率显著升高，差异均具有统计学意义( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。结果提示，冰荷洗剂水提、冰荷洗剂醇提、冰荷洗剂部分水提部分醇提及冰荷洗剂挥发油具有明显的抗炎消肿作用，且冰荷洗剂挥发油作用要优于其他工艺组。

表 2 各组小鼠耳廓二甲苯致炎结果比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	肿胀度(mg)	抑制率(%)
空白对照组	10	10.92 ± 2.18	0
冰荷洗剂水提组	10	8.52 ± 1.95 <sup>①</sup>	21.8 <sup>②</sup>
冰荷洗剂醇提组	10	8.37 ± 1.81 <sup>②</sup>	23.4 <sup>②</sup>
冰荷洗剂部分水提部分醇提组	10	8.21 ± 1.89 <sup>②</sup>	24.8 <sup>②</sup>
冰荷洗剂挥发油组	10	7.59 ± 1.66 <sup>②</sup>	30.5 <sup>②</sup>

与空白对照组比较，① $P < 0.05$ ，② $P < 0.01$

3.2 各组豚鼠皮肤致敏实验结果比较 见表 3、表 4。模型组的致敏率为 100%，而冰荷洗剂水提组、冰荷洗剂醇提组、冰荷洗剂部分水提部分醇提组及冰荷洗剂挥发油组致敏率均为 0。与空白对照组比较，模型组豚鼠致敏率较高，差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。与模型组比较，冰荷洗剂水提组、冰荷洗剂醇提组、冰荷洗剂部分水提部分醇提组及冰荷洗剂挥发油组豚鼠致敏率较低，差异均有统计学意义( $P < 0.01$ )。结果提示，冰荷洗剂水提、冰荷洗剂醇提、冰荷洗剂部分水提部分醇提及冰荷洗剂挥发油均对豚鼠无致敏性。

表 3 冰荷洗剂致皮肤过敏反应情况

组别	n	时间	红斑反应强度					水肿反应强度				
			0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
			空白对照组	10	24 h	10	0	0	0	0	10	0
		48 h	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0
		72 h	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0
模型组	10	24 h	0	8	2	0	0	0	9	1	0	0
		48 h	1	7	2	0	0	2	8	0	0	0
		72 h	3	6	1	0	0	4	6	0	0	0
冰荷洗剂水提组	10	24 h	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0
		48 h	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0
		72 h	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0
冰荷洗剂醇提组	10	24 h	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0
		48 h	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0
		72 h	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0

例

(续表3)

组别	n	时间	红斑反应强度					水肿反应强度				
			0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
冰荷洗剂部分水提部分醇提组	10	24 h	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0
		48 h	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0
		72 h	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0
冰荷洗剂提挥发油组	10	24 h	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0
		48 h	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0
		72 h	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0

表4 冰荷洗剂致皮肤过敏发生率结果比较 %

组别	n	皮肤过敏发生率
空白对照组	10	0
模型组	10	100 <sup>①</sup>
冰荷洗剂水提组	10	0 <sup>②</sup>
冰荷洗剂醇提组	10	0 <sup>②</sup>
冰荷洗剂部分水提部分醇提组	10	0 <sup>②</sup>
冰荷洗剂提挥发油组	10	0 <sup>②</sup>

与空白对照组比较, ① $P < 0.05$ ; 与模型组比较, ② $P < 0.05$

#### 4 讨论

龟头炎为男科临床常见病, 其病因多与包皮垢、尿液、碱性物质和外来刺激、摩擦、创伤, 或包皮过长未能经常清洗, 以及不洁性接触史等密切相关, 亦可由细菌、真菌感染或药物过敏引起<sup>⑨</sup>。龟头炎危害生殖系统健康, 引发泌尿系统疾病, 导致性功能障碍, 造成不育症等, 故亟待研究开发出治疗该病的疗效确切药物。

二甲苯致小鼠耳廓肿胀是经典的急性炎症药效评价模型, 其致炎机制主要是以二甲苯为致炎剂, 诱导组胺、激肽及纤维蛋白溶解酶等炎症介质释放, 引起局部毛细血管通透性的增加、炎症细胞的浸润、急性渗出性炎性水肿, 从而模拟人类的炎症病理特征<sup>⑩</sup>。研究结果显示, 冰荷洗剂水提、冰荷洗剂醇提、冰荷洗剂部分水提部分醇提及冰荷洗剂提挥发油均能不同程度抑制二甲苯致小鼠耳廓肿胀, 升高耳肿胀抑制率。结果提示, 不同制备工艺的冰荷洗剂均具有明显的抗炎作用, 其作用机制可能与抑制组胺、激肽及纤维蛋白溶解酶等炎症介质的释放有关。本研究显示, 冰荷洗剂提挥发油的抗炎作用优于其他工艺组, 可能与挥发油的透皮吸收效率有关, 其确切的作用机制有待于进一步研究。

皮肤过敏性评价是外用制剂的常用安全性评价指标。药物及药用辅料均可能成为致敏原, 诱发皮肤局部过敏反应, 严重者引起全身性过敏反应, 造成使用者伤亡<sup>⑪</sup>。2, 4-二硝基氯代苯为国际公认的极强致敏剂, 2, 4-二硝基氯代苯致豚鼠

皮肤过敏试验是经典的皮肤过敏性评价模型。本研究结果显示, 冰荷洗剂水提组、冰荷洗剂醇提组、冰荷洗剂部分水提部分醇提及冰荷洗剂提挥发油组致敏率均为0, 提示各制备工艺所制备的冰荷洗剂均对豚鼠无致敏性, 即各制备工艺所制备的冰荷洗剂临床使用是安全的。

#### [参考文献]

- [1] 刘瑞连, 严建业, 李顺祥, 等. 正交试验法优选冰荷洗剂醇提工艺[J]. 湖南中医药大学学报, 2012, 32(9): 33-36.
- [2] 刘颖. 冰荷合剂治疗念珠菌性龟头炎疗效护理观察[J]. 中国性科学, 2010, 19(9): 21-23.
- [3] 谭育红, 朱湘生, 尹春辉, 等. 冰荷合剂治疗湿热证龟头炎临床观察[J]. 中国医药导报, 2008, 5(11): 110-111.
- [4] 朱湘生, 谭育红, 刘颖, 等. 冰荷合剂治疗念珠菌性龟头炎30例临床观察[J]. 中医药导报, 2007, 13(11): 34-36.
- [5] 谢丽莎, 蒙田秀, 欧阳炜, 等. 千年健镇痛抗炎药理研究[J]. 宁夏农林科技, 2012, 53(9): 159-160.
- [6] 张兴荣, 周芳, 廖月葵, 等. 古钩藤镇痛抗炎药理作用的实验研究[J]. 时珍国医国药, 2007, 18(7): 1603-1604.
- [7] 赵勤, 胡锐, 葛明娟, 等. 大秦艽汤抗炎作用研究[J]. 中药药理与临床, 2012, 28(3): 21-22.
- [8] 滕志敏, 赵杰. 复方苦参膏对皮肤刺激性和致敏性的实验研究[J]. 中国民族民间医药, 2008, 17(9): 47-48.
- [9] Pulido-Perez A, Suarez-Fernandez R. Circinate Balanitis[J]. N Engl J Med, 2017, 376(2): 157.
- [10] 谷捷, 李鑫, 余黄合, 等. 二甲苯致小鼠耳廓肿胀急性炎症模型的建立[J]. 湖南中医药大学学报, 2016, 36(5): 32-35.
- [11] Lockey RF, Teng MN. Human passive cutaneous anaphylaxis in the 21st century: Worth the risk?[J]. J Allergy Clin Immunol, 2017, 139(6): 1795-1796.

(责任编辑: 冯天保, 郑锋玲)