

## 多指标-响应曲面法优选酒炖熟地黄最佳炮制工艺

王 勃, 张晓燕, 吕辰子, 何美菁, 孟祥龙, 张朔生\*

山西中医药大学, 山西 晋中 030619

**摘要:**目的 基于响应曲面技术, 应用 HPLC 法定量测定, 从多指标、综合评价的角度建立酒炖熟地黄的最佳炮制工艺。方法 采用 HPLC 定量分析, 以地黄苷 D、益母草苷、5-羟甲基糠醛(5-HMF)和毛蕊花糖苷为评价指标, 采用响应曲面设计法考察地黄浸润时间、加黄剂量、炖制时间、干燥温度、干燥时间对酒炖熟地黄炮制工艺的影响, 寻找出最佳炮制工艺。结果 色谱柱为 Tnature-C<sub>18</sub> 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 体积流量为 1 mL/min, 柱温为 25 ℃。地黄苷 D 和益母草苷定量测定: 流动相为乙腈-0.1%磷酸水溶液(4:96), 检测波长为 203 nm; 5-HMF 和毛蕊花糖苷定量测定: 流动相为乙腈-0.1%磷酸水溶液, 梯度洗脱: 0~15 min, 11%乙腈; 15~15.1 min, 11%~16%乙腈; 15.1~50 min, 16%乙腈; 检测波长为 334 nm。酒炖熟地黄的最佳工艺为 100 kg 生地加入黄酒 60 kg, 浸润 12 h, 密闭炖制 38 h, 在 76 ℃干燥 33 h。结论 所建立的 HPLC 法稳定可行, 适合所选成分的测定。采用响应面法建立的模型相对准确, 可以较好地预测 4 种成分含量; 优选的酒炖熟地黄炮制工艺方法可行, 为制定熟地黄的质量标准和现代研究提供了科学依据。

**关键词:** 熟地黄; 中药炮制; 酒炖; HPLC; 地黄苷 D; 益母草苷; 5-羟甲基糠醛; 毛蕊花糖苷; 多指标-响应曲面法; 综合评价; 质量标准

中图分类号: R283.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)09-2065-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.09.009

## Process optimization for *Rehmanniae Radix Praeparata* with yellow wine stewing by multi-index-response surface method

WANG Bo, ZHANG Xiao-yan, LV Chen-zi, HE Mei-jing, MENG Xiang-long, ZHANG Shuo-sheng

Shanxi University of Chinese Medicine, Jinzhong 030619, China

**Abstract: Objective** Based on response surface methodology, the best processing technique for *Rehmanniae Radix Praeparata* was established in the aspects of multiple evaluations and comprehensive evaluations by the quantitative determination of HPLC. **Methods** The content of rehmannioside D, ajugol, 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde (5-HMF) and verbascoside was used as the evaluation index in the quantitative analysis of HPLC. The response surface methodology was used to investigate the ingestion time of *Rehmanniae Radix Praeparata*, the adding amount of yellow wine, the stewing time, the drying temperature and the drying time with aim to find the best processing technology. **Results** The column was a Tnature-C<sub>18</sub> column (250 mm×4.6 mm, 5 μm) with volume flow of 1 mL/min and column temperature of 25 ℃. The elution conditions for the quantitative determination of rehmannioside D and ajugol were as follow: The mobile phase was acetonitrile-0.1% phosphoric acid water (4:96), and the detection wavelength was 203 nm; That for 5-HMF and verbascoside was as follow: The mobile phase was acetonitrile-0.1% phosphoric acid water (0—15 min, acetonitrile content was 11%; 15—15.1 min, acetonitrile content was 11%—16%; 15.1—50 min, acetonitrile content was 16%) and the detection wavelength was 334 nm. The best technology for *Rehmanniae Radix Praeparata* with yellow wine stewing was: adding 100 kg of yellow wine 60 kg for infiltrating 12 h, sealing and stewing for 38 h, drying at 76 ℃ for 33 h. **Conclusion** The established HPLC method was stable and feasible, suitable for the determination of the selected components. The model established by the response surface method was relatively accurate and can be used to predict the content of the four components well. The optimized process with yellow wine stewing method was feasible, which provided a scientific basis for the formulation of quality standards and modern research of *Rehmanniae Radix Praeparata*.

收稿日期: 2018-11-29

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81673601)

作者简介: 王 勃(1994—), 在读硕士, 从事中药炮制现代研究。Tel: 18435166790 E-mail: 18435166790@163.com

\*通信作者 张朔生, 教授, 博士生导师, 从事中药炮制现代研究及新产品开发。Tel: (0351)3179909 E-mail: zhangshuosheng@aliyun.com

**Key words:** *Rehmanniae Radix Praeparata*; preparation of Chinese materia medica; stewing with wine; HPLC; retinoid D; leonuridine; 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde; verbascoside; multiple indicators-response surface method; comprehensive evaluation; quality standard

地黄为玄参科植物地黄 *Rehmannia glutinosa* (Gaertn.) Libosch. ex Fisch. et Mey. 的块根, 始载于《神农本草经》, 列为上品, 为我国 4 大怀药之一, 《中国药典》2015 年版<sup>[1]</sup>地黄项下共收载鲜地黄、生地黄、酒炖地黄、清蒸地黄 4 种炮制品。其中经过生地黄炮制而成的熟地黄, 其性由寒转温, 其味由苦转甘, 其功效由清转补, 以滋阴补血、益精填髓为主。在治疗血虚萎黄、晕眩、失眠及月经不调、崩漏等症方面具有显著疗效, 也可用于肾阴不足、骨蒸潮热证及盗汗等症<sup>[2]</sup>。生熟之品药性迥异, 无论从化学成分的含量还是炮制前后的种类来说都具有明显差别<sup>[3-5]</sup>, 且从古至今熟地黄独特药效一直在中医药领域被众多医药家所重视。

熟地黄一词始见于唐·孙思邈《备急千金要方》<sup>[6]</sup>, 宋代《证类本草》对熟地黄炮制品的质量提出了“光黑如漆, 味甘如饴”的质量标准, 沿用至今。酒制熟地黄始见梁代《本草经集注》<sup>[7]</sup>酒浸法, 南北朝《雷公炮炙论》<sup>[8]</sup>始创以酒为辅料来拌蒸, 宋代《普济本事方》<sup>[9]</sup>、《史载之方》<sup>[10]</sup>对熟地黄的酒制法出现了“蒸九遍用酒制造”和“酒酒九蒸九曝, 焙干”的方法, 明清时期仍沿用酒九蒸的炮制方法, 故历代本草对熟地黄的加工炮制工艺记载及争议颇多。熟地黄制法各异, 然皆以“光黑如漆, 味甘如饴”为质量评价、以“九蒸九晒”为达到炮制时间较长的制作要求, 同时在传统经验上还要求“太过则性味发酸”的准则<sup>[11]</sup>。但是在《中国药典》2015 年版熟地黄项下酒炖法只是规定: “100 kg 药材, 加入黄酒, 炖制酒吸尽, 晾晒至外皮黏液稍干”<sup>[1]</sup>。基于此, 本实验以优化酒炖熟地黄炮制工艺为目标, 采用响应曲面法 (response surface methodology, RSM), 多指标量化熟地黄最佳制备方案, 为制定熟地黄的质量标准和现代研究提供科学依据。

## 1 仪器和材料

### 1.1 仪器

Thermo Fisher Scientific U3000 高效液相色谱仪, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司; GZX-9076 MBE 电热鼓风干燥箱, 上海博讯实业有限公司医疗设备厂; AX224ZH/E 十万分之一电子天平, 奥豪斯

仪器有限公司制造; SB-5200DTD 超声波清洗机, 宁波新芝生物科技股份有限公司; ACL-2007 电磁炉, 江门市威多福电器有限公司; RRHP-100 万能高速粉碎机, 浙江红景天工贸有限公司; HH-2 型电热恒温水浴锅, 金坛市杰瑞尔电器有限公司; 水为超纯水, 乙腈为色谱纯, 甲醇、磷酸为分析纯。

### 1.2 材料

对照品地黄苷 D (批号 140402)、益母草苷 (批号 130911)、5-羟甲基糠醛 (5-HMF, 批号 14099)、毛蕊花糖苷 (批号 MST-13122711), 质量分数均≥98%, 均购自成都曼斯特生物科技有限公司。

生地黄饮片采自山西省临汾市襄汾县, 经山西中医药大学中药学院张朔生教授鉴定为玄参科地黄属植物地黄 *Rehmannia glutinosa* (Gaertn.) Libosch. ex Fisch. et Mey. 的干燥块根加工制成的饮片。

## 2 方法与结果

### 2.1 地黄苷 D、益母草苷、5-HMF、毛蕊花糖苷的定量测定及综合评价指标确定

**2.1.1 色谱条件** 色谱柱为 Tnature-C<sub>18</sub> 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 体积流量为 1 mL/min, 柱温为 25 °C。熟地黄中地黄苷 D、益母草苷定量测定: 流动相为乙腈-0.1%磷酸水溶液 (4:96), 检测波长为 203 nm; 5-HMF 和毛蕊花糖苷定量测定: 流动相为乙腈-0.1%磷酸水溶液, 梯度洗脱: 0~15 min, 11%乙腈; 15~15.1min, 11%~16%乙腈; 15.1~50 min, 16%乙腈; 检测波长为 334 nm<sup>[12]</sup>。

**2.1.2 对照品溶液的制备** 精密称取干燥至恒定质量的地黄苷 D、益母草苷、5-HMF、毛蕊花糖苷对照品适量, 加甲醇定容。分别制成含地黄苷 D 1.265 mg/mL、益母草苷 1.213 5 mg/mL 的混合对照品溶液和含 5-HMF 0.4 mg/mL、毛蕊花糖苷 0.209 mg/mL 的混合对照品溶液。

### 2.1.3 样品的炮制和供试品溶液的制备

(1) 酒炖熟地黄的制备: 取生地黄饮片, 大小分档, 先加入黄酒进行闷润, 待黄酒被吸尽, 放置蒸锅内隔水炖至规定时间, 取出, 放置在烘箱内, 烘规定时间即为酒炖熟地黄 (《中国药典》2015 年版, 酒炖法通则 0213) 样品。

(2) 供试品溶液的制备: 取酒炖熟地黄各样品,

用万能高速粉碎机粉碎,过 1 号筛,取样品粉末 0.5 g 置于 50 mL 量瓶中,加甲醇溶解并定容,置于室温下冷浸 12 h 后超声提取 1.5 h,冷却至室温,补足减失的质量,滤过,取续滤液 25 mL,蒸干,残渣用 15% 甲醇溶解,定容至 5 mL。用 0.45  $\mu\text{m}$  微孔滤膜滤过,即得供试品溶液<sup>[13]</sup>。所有样品均平行制备 2 份。

**2.1.4 系统适应性试验和专属性试验** 分别精密吸取地黄苷 D、益母草苷、5-HMF 和毛蕊花糖苷对照品溶液、供试品溶液(响应曲面试验中 2 号样品)各 10  $\mu\text{L}$ ,注入液相色谱仪,测定。结果表明地黄苷 D、益母草苷、5-HMF 和毛蕊花糖苷的保留时间依次为 9.200、14.493、4.833、41.770 min。各对照品与供试品其他组分分离度良好( $R>1.5$ )。色谱图见图 1、2。

**2.1.5 线性关系考察** 将“2.1.2”项下各对照品分别配成地黄苷 D 质量浓度为 0.352、0.704、1.007、

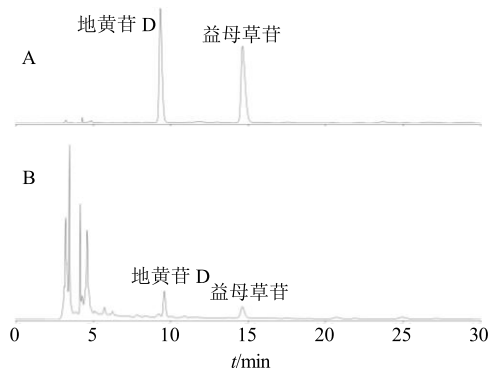


图 1 地黄苷 D 和益母草苷混合对照品 (A) 及样品 (B) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC of retinoid D and leonuridine mixed reference substances (A) and test solution (B)

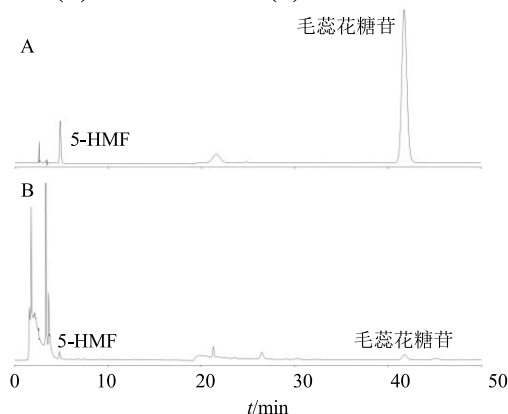


图 2 5-HMF 和毛蕊花糖苷混合对照品 (A) 及样品 (B) 的 HPLC 图

Fig. 2 HPLC of 5-HMF and verbascoside mixed reference substances (A) and test solution (B)

1.308、1.610、2.103 mg/mL 的溶液;益母草苷质量浓度为 13.50、16.20、20.25、27.00、40.50、81.00  $\mu\text{g/mL}$  的溶液;5-HMF 质量浓度为 0.028、0.040、0.060、0.080、0.100、0.160 mg/mL 的溶液;毛蕊花糖苷质量浓度为 2.926、5.852、8.360、13.376、16.720、27.600  $\mu\text{g/mL}$  的溶液。按“2.1.1”项下色谱条件各进样 10  $\mu\text{L}$ ,测定峰面积。将所得峰面积与各对照品的质量浓度进行线性回归,得回归方程、相关系数( $r$ )及线性范围分别为地黄苷 D  $Y=15.228 X+0.084 5$ ,  $r^2=0.999 4$ , 0.352~2.103 mg/mL;益母草苷  $Y=15.127 X+0.006 8$ ,  $r^2=0.999 3$ , 13.50~81.00  $\mu\text{g/mL}$ ;5-HMF  $Y=7.113 4 X-0.052 2$ ,  $r^2=0.999 0$ , 0.028~0.160 mg/mL;毛蕊花糖苷  $Y=168.03 X+0.074 6$ ,  $r^2=0.999 5$ , 2.926~27.600  $\mu\text{g/mL}$ 。

**2.1.6 精密度考察** 将“2.1.2”项下对照品溶液重复进样 6 次,进行精密度试验,结果地黄苷 D 峰面积 RSD 为 0.74%,益母草苷峰面积 RSD 为 0.60%,5-HMF 峰面积 RSD 为 0.51%,毛蕊花糖苷峰面积 RSD 为 1.55%。

**2.1.7 稳定性考察** 于 1、2、4、8、16、24 h 测定同一份供试品溶液(“2.2.2”项下含 60% 黄酒量的样品)的稳定性,得地黄苷 D 峰面积 RSD 为 1.55%,益母草苷峰面积 RSD 为 2.07%,5-HMF 峰面积 RSD 为 2.08%,毛蕊花糖苷峰面积 RSD 为 2.04%。

**2.1.8 重复性考察** 取同一炮制方法下的样品(“2.2.2”项下含 60% 黄酒量的样品),依“2.1.3”项下供试品溶液的制备方法,分别平行制样 6 份。分别精密量取 10  $\mu\text{L}$ ,按前述色谱条件进样,测定峰面积。结果地黄苷 D 质量分数 RSD 为 1.69%,益母草苷质量分数 RSD 为 1.06%,5-HMF 质量分数 RSD 值 0.30%,毛蕊花糖苷质量分数 RSD 为 0.16%。

**2.1.9 加样回收率考察** 精密量取已测定的酒炖熟地黄供试品溶液(“2.2.2”项下含 60% 黄酒量的样品)3 份,每份 1 mL,分别按供试品指标成分含量的 80%、100%、120% 精密加入一定量的混合对照品溶液(地黄苷 D 0.657 mg/mL、益母草苷 0.054 mg/mL、5-HMF 0.035 mg/mL、毛蕊花糖苷 0.007 mg/mL),每个质量浓度平行 3 份,按“2.1.1”项下色谱条件测定各指标成分的含量。可得平均回收率和 RSD。结果表明地黄苷 D 平均回收率为 98.86%,RSD 为 1.87%;益母草苷平均回收率为 100.34%,RSD 为 1.52%;5-HMF 平均回收率为 99.62%,RSD 为 1.59%;毛蕊花糖苷平均回收率为 99.83%,RSD

为 1.62%。

**2.1.10 样品测定** 精密称取单因素及响应曲面试验的样品,按照“2.1.3”项下方法制备供试品溶液,进样测定。每份样品平行制备 2 份且重复测定 2 次,计算样品中各有效成分的含量平均值。

**2.1.11 综合评价指标** 采用多指标-响应曲面法进行综合评价,依据其药理作用和目前的研究进展进行各个指标的权重分配,综合得分( $Z$ )=地黄苷 D 得分 $\times$ 30%+益母草苷得分 $\times$ 30%+5-HMF 得分 $\times$ 10%+毛蕊花糖苷得分 $\times$ 30%。指标得分=该指标含量/该指标所在组中最高含量。本实验的单因素和响应曲面分析均以综合评分的结果为主,各个指标的各自含量结果为辅进行分析<sup>[14]</sup>。

## 2.2 酒炖熟地黄影响因素的单因素实验

**2.2.1 焖润时间的考察** 称取生地黄饮片 20 g,加 40%量黄酒,浸泡不同时间,观察药材浸润情况,结果显示,浸泡 12 h,即可使药材润至完全透心,故确定炖制工艺的药材浸泡时间为 12 h。

**2.2.2 黄酒量的考察** 根据《中国药典》2015 年版,熟地黄酒炖依照炮制通则,加黄酒量 30%~50%,故在进行黄酒量考察时,称取生地黄饮片 20 g,分别加入黄酒 20%、30%、40%、50%、60%,焖润

12 h,密闭炖制 24 h,在 60 ℃下干燥 30 h,取出,放凉。依法进行提取和检测,考察不同黄酒量对酒炖地黄各指标的影响,结果见表 1。可见地黄苷 D 和 5-HMF 的含量在 20%~40%的黄酒量下出现起伏,在 30%的黄酒量下出现最高值。此外,除地黄苷 D 外,其余指标均在 60%黄酒量下出现明显的高值。根据综合评分来看,60%黄酒量下的总得分也是最高。综上所述,将黄酒量设定为 100 kg 药材 60 kg 黄酒进行实验。

**2.2.3 炖制时间的考察** 称取生地黄饮片 20 g,加入黄酒 40%,焖润 12 h,分别密闭炖制 12、16、20、24、28、32、36、40、44 h,在 60 ℃下干燥 30 h,取出,放凉。依法进行提取和检测,考察不同炖制时间对酒炖地黄各指标的影响<sup>[15-19]</sup>。结果见表 2。可见地黄苷 D、5-HMF 的含量在炖制 44 h 时出现最高值,但是在 36 h 处均出现转折点,且在此点处的含量均接近于最高值,益母草苷在 36 h 处达到最优值,5-HMF 含量一直上升,但 36 h 处的值也接近于最大值。综上所述,以综合评分为主,各个指标含量为辅进行分析,选取 32、36、40 h 3 个点进行响应曲面实验,在此范围内,综合评分和 4 个指标均有相对最优值。

表 1 不同黄酒量下指标成分的含量和综合评分

Table 1 Content and comprehensive scores of indicator components in different amounts of yellow wine

| 黄酒量/% | 地黄苷 D/(mg·g <sup>-1</sup> ) | 益母草苷/(mg·g <sup>-1</sup> ) | 5-HMF/(mg·g <sup>-1</sup> ) | 毛蕊花糖苷/(mg·g <sup>-1</sup> ) | 综合评分    |
|-------|-----------------------------|----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|---------|
| 20    | 15.638 2                    | 0.524 3                    | 0.757 8                     | 0.098 7                     | 0.664 1 |
| 30    | 16.463 9                    | 0.520 3                    | 0.852 4                     | 0.076 5                     | 0.650 1 |
| 40    | 15.903 3                    | 0.882 2                    | 0.700 3                     | 0.067 7                     | 0.687 4 |
| 50    | 14.617 6                    | 0.916 0                    | 0.688 7                     | 0.168 9                     | 0.848 9 |
| 60    | 14.350 1                    | 1.144 2                    | 0.863 6                     | 0.169 8                     | 0.916 8 |

表 2 不同炖制时间下指标成分的含量和综合评分

Table 2 Content and comprehensive scores of indicator components at different stewing time

| 炖制时间/h | 地黄苷 D/(mg·g <sup>-1</sup> ) | 益母草苷/(mg·g <sup>-1</sup> ) | 5-HMF/(mg·g <sup>-1</sup> ) | 毛蕊花糖苷/(mg·g <sup>-1</sup> ) | 综合评分    |
|--------|-----------------------------|----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|---------|
| 12     | 5.622 6                     | 1.043 1                    | 1.076 9                     | 0.272 7                     | 0.677 1 |
| 16     | 11.587 4                    | 0.726 2                    | 0.523 8                     | 0.089 1                     | 0.417 9 |
| 20     | 13.835 5                    | 0.933 0                    | 0.654 7                     | 0.116 0                     | 0.528 4 |
| 24     | 14.014 9                    | 0.889 5                    | 0.683 7                     | 0.100 3                     | 0.502 7 |
| 28     | 19.686 5                    | 0.681 0                    | 1.154 2                     | 0.104 3                     | 0.526 8 |
| 32     | 21.669 3                    | 0.917 8                    | 1.303 7                     | 0.102 9                     | 0.612 5 |
| 36     | 29.594 9                    | 1.146 0                    | 1.706 0                     | 0.114 6                     | 0.776 0 |
| 40     | 22.823 4                    | 0.820 9                    | 1.356 2                     | 0.168 8                     | 0.672 5 |
| 44     | 33.515 7                    | 0.709 1                    | 2.006 3                     | 0.114 5                     | 0.711 6 |

**2.2.4 干燥温度的考察** 称取生地黄饮片 20 g, 加入黄酒 40%, 焖润 12 h, 密闭炖制 24 h, 分别在 50、60、70、80、90 °C 下干燥 30 h, 取出, 放凉。依法进行提取和检测, 考察不同干燥温度对酒炖地黄各指标的影响。结果见表 3。可见地黄苷 D 的质量分数随着干燥温度的升高总体趋势为不断上升, 在 90 °C 处有最高值, 在 60 °C 左右出现转折点, 且在 60~80 °C 时质量分数值接近于最优值; 益母草苷和毛蕊花糖苷均在 70 °C 处出现相对最高值。由于 5-HMF 的特殊性, 其含量一直上升, 但在 60~80 °C 的含量值也近似于最优值。综上所述, 以综合评分为主, 各个指标含量为辅进行分析, 选取 60、70、80 °C 3 个点进行响应曲面实验, 在此范围内, 综

合评分和 4 个指标均有相对最优值。

**2.2.5 干燥时间的考察** 称取生地黄饮片 20 g, 加入黄酒 40%, 焖润 12 h, 密闭炖制 24 h, 分别在 60 °C 下干燥 24、30、36、42、48 h, 取出, 放凉。依法进行提取和检测, 考察不同干燥时间对酒炖地黄各指标的影响。结果见表 4。可见地黄苷 D、益母草苷和 5-HMF 的含量随着干燥时间的升高, 在 30~42 h 内的最高值近似于各自的最优值, 同时将转折点包含在此范围内, 且毛蕊花糖苷的含量在 36 h 处出现最高值。综上所述, 以综合评分为主, 各个指标含量为辅进行分析, 选取 30、36、42 h 3 个点进行响应曲面实验, 在此范围内, 综合评分和 4 个指标含量均有相对最优值。

表 3 不同干燥温度下指标成分的含量和综合评分

Table 3 Content and comprehensive scores of indicator components at different drying temperatures

| 干燥温度/°C | 地黄苷 D/(mg·g <sup>-1</sup> ) | 益母草苷/(mg·g <sup>-1</sup> ) | 5-HMF/(mg·g <sup>-1</sup> ) | 毛蕊花糖苷/(mg·g <sup>-1</sup> ) | 综合评分    |
|---------|-----------------------------|----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|---------|
| 50      | 10.611 2                    | 0.894 2                    | 0.821 8                     | 0.339 8                     | 0.744 1 |
| 60      | 19.382 0                    | 0.790 9                    | 1.070 1                     | 0.120 4                     | 0.617 3 |
| 70      | 15.789 9                    | 0.878 5                    | 0.830 7                     | 0.309 7                     | 0.766 5 |
| 80      | 19.293 2                    | 0.583 8                    | 1.077 2                     | 0.139 5                     | 0.564 0 |
| 90      | 28.784 5                    | 0.418 2                    | 2.454 5                     | 0.132 3                     | 0.657 1 |

表 4 不同干燥时间下指标成分的含量和综合评分

Table 4 Content and comprehensive scores of indicator components for different drying time

| 干燥时间/h | 地黄苷 D/(mg·g <sup>-1</sup> ) | 益母草苷/(mg·g <sup>-1</sup> ) | 5-HMF/(mg·g <sup>-1</sup> ) | 毛蕊花糖苷/(mg·g <sup>-1</sup> ) | 综合评分    |
|--------|-----------------------------|----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|---------|
| 24     | 18.352 8                    | 0.866 7                    | 1.008 0                     | 0.090 9                     | 0.770 7 |
| 30     | 18.280 9                    | 0.919 9                    | 1.045 4                     | 0.091 7                     | 0.789 4 |
| 36     | 16.500 9                    | 0.982 0                    | 0.881 1                     | 0.154 5                     | 0.853 1 |
| 42     | 14.896 3                    | 1.043 4                    | 0.777 8                     | 0.118 0                     | 0.782 8 |
| 48     | 18.686 5                    | 0.406 7                    | 0.781 2                     | 0.209 2                     | 0.791 7 |

## 2.3 响应曲面实验

**2.3.1 响应曲面法的设计与结果** 结合单因素实验结果, 以炖制时间 (A)、干燥温度 (B)、干燥时间 (C) 为 3 个考察因素, 分别以地黄苷 D、益母草苷、5-HMF、毛蕊花糖苷的含量和综合评分为响应值, 设计 3 因素 3 水平试验设计方案, 根据 Box-Behnken 的中心组合设计原理, 经 Design-Expert V8.0.6 软件分析处理, 设计出 3 因素 3 水平共 17 组试验<sup>[20-21]</sup>, 试验方案及结果见表 5。

**2.3.2 方差分析** 应用 Design-Expert.V8.0.6 软件对酒炖熟地黄炮制工艺实验数据进行分析, 得到综合得分对炖制时间 (A)、干燥温度 (B)、干燥时间 (C) 的 2 次多元回归模型方程, 方程为综合评分=

$-4.838\ 10+0.084\ 339\ A+0.058\ 768\ B+0.115\ 46\ C+1.066\ 25\ AB-1.232\ 29\times 10^{-3}\ AC+2.758\ 33\times 10^{-4}\ BC-1.665\ 78\times 10^{-3}\ A^2-7.132\ 75\times 10^{-4}\ B^2-1.368\ 13\times 10^{-3}\ C^2$ , 工艺回归模型方差分析结果见表 6。酒炖熟地黄工艺的回归模型  $F=5.83$ ,  $P=0.014\ 9<0.05$ , 表明 2 次多元回归模型显著, 而模型决定系数  $R^2=0.882\ 4$ ,  $R_{adj}^2=0.731\ 2$ , 变异系数 (CV)=6.16%, 表明模型拟合较好;  $F_{失拟}=4.89$ ,  $P=0.079\ 6>0.05$ , 模型失拟度不显著, 模型选择较为合适, 可以用于酒炖熟地黄的工艺分析。模型的残差可能是随机误差产生的由表中数据得 1 次项 B 对模型有显著影响, 交互项均未有显著影响, 2 次项  $B^2$  对模型有显著影响。

表 5 酒炖熟地黄响应曲面实验结果

Table 5 Results of response surface test of *Rehmanniae Radix Praeparata* with yellow wine stewing

| 序号 | A/h     | B/°C    | C/h     | 地黄苷 D/(mg·g <sup>-1</sup> ) | 益母草苷/(mg·g <sup>-1</sup> ) | 5-HMF/(mg·g <sup>-1</sup> ) | 毛蕊花糖苷/(mg·g <sup>-1</sup> ) | 综合评分    |
|----|---------|---------|---------|-----------------------------|----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|---------|
| 1  | 32 (-1) | 60 (-1) | 36 (0)  | 26.988 9                    | 0.842 2                    | 0.775 0                     | 0.021 9                     | 0.674 6 |
| 2  | 36 (0)  | 70 (0)  | 36      | 32.022 8                    | 0.573 1                    | 0.979 1                     | 0.073 1                     | 0.814 1 |
| 3  | 36      | 70      | 36      | 32.390 5                    | 0.601 5                    | 0.989 6                     | 0.074 1                     | 0.831 6 |
| 4  | 32      | 70      | 42 (+1) | 24.706 3                    | 0.761 7                    | 0.806 6                     | 0.063 0                     | 0.766 2 |
| 5  | 40 (+1) | 70      | 30 (-1) | 30.183 7                    | 0.794 5                    | 0.709 8                     | 0.054 6                     | 0.792 7 |
| 6  | 36      | 60      | 30      | 28.775 7                    | 0.559 6                    | 0.730 4                     | 0.067 4                     | 0.742 0 |
| 7  | 36      | 80 (+1) | 30      | 32.117 7                    | 0.510 0                    | 0.998 1                     | 0.068 5                     | 0.778 7 |
| 8  | 36      | 60      | 42      | 27.178 4                    | 0.363 4                    | 0.768 7                     | 0.048 8                     | 0.598 6 |
| 9  | 32      | 70      | 30      | 25.858 6                    | 0.574 6                    | 0.702 8                     | 0.089 0                     | 0.791 2 |
| 10 | 36      | 70      | 36      | 30.418 0                    | 0.562 6                    | 0.978 1                     | 0.073 4                     | 0.796 6 |
| 11 | 40      | 80      | 36      | 32.579 3                    | 0.790 1                    | 1.364 3                     | 0.056 1                     | 0.866 3 |
| 12 | 40      | 60      | 36      | 28.595 3                    | 0.330 9                    | 0.929 3                     | 0.033 9                     | 0.561 8 |
| 13 | 32      | 80      | 36      | 31.252 3                    | 0.579 6                    | 0.982 5                     | 0.072 8                     | 0.808 5 |
| 14 | 36      | 70      | 36      | 29.542 2                    | 0.855 2                    | 0.985 9                     | 0.067 5                     | 0.871 8 |
| 15 | 36      | 70      | 36      | 31.930 6                    | 0.550 6                    | 1.011 7                     | 0.075 2                     | 0.814 8 |
| 16 | 36      | 80      | 42      | 31.577 1                    | 0.416 3                    | 1.054 6                     | 0.055 6                     | 0.701 5 |
| 17 | 40      | 70      | 42      | 25.807 0                    | 0.408 4                    | 0.793 5                     | 0.062 4                     | 0.649 4 |

表 6 酒炖熟地黄工艺回归模型方差分析结果

Table 6 Results of variance analysis of regression model of *Rehmanniae Radix Praeparata* with yellow wine stewing

| 来源 | 平方和                    | 自由度 | 离差平方和                  | F 值   | P 值     | 来源             | 平方和                    | 自由度 | 离差平方和                  | F 值  | P 值     |
|----|------------------------|-----|------------------------|-------|---------|----------------|------------------------|-----|------------------------|------|---------|
| 模型 | 0.110                  | 9   | 0.013                  | 5.83  | 0.014 9 | A <sup>2</sup> | 2.991×10 <sup>-3</sup> | 1   | 2.991×10 <sup>-3</sup> | 1.38 | 0.279 2 |
| A  | 3.625×10 <sup>-3</sup> | 1   | 3.625×10 <sup>-3</sup> | 1.67  | 0.237 6 | B <sup>2</sup> | 0.021                  | 1   | 0.021                  | 9.85 | 0.016 4 |
| B  | 0.042                  | 1   | 0.042                  | 19.21 | 0.003 2 | C <sup>2</sup> | 0.01                   | 1   | 0.010                  | 4.70 | 0.066 9 |
| C  | 0.019                  | 1   | 0.019                  | 8.70  | 0.021 4 | 残差             | 0.015                  | 7   | 2.174×10 <sup>-3</sup> |      |         |
| AB | 7.276×10 <sup>-3</sup> | 1   | 7.276×10 <sup>-3</sup> | 3.35  | 0.110 0 | 失拟项            | 0.012                  | 3   | 3.986×10 <sup>-3</sup> | 4.89 | 0.079 6 |
| AC | 3.499×10 <sup>-3</sup> | 1   | 3.499×10 <sup>-3</sup> | 1.61  | 0.245 1 | 纯误差            | 3.26×10 <sup>-3</sup>  | 4   | 8.150×10 <sup>-4</sup> |      |         |
| BC | 1.096×10 <sup>-3</sup> | 1   | 1.096×10 <sup>-3</sup> | 0.50  | 0.500 7 | 总和             | 0.13                   | 16  |                        |      |         |

P&lt;0.05 表明差异显著

P&lt;0.05 indicates significant difference

**2.3.3 响应面分析** 通过 3D 图, 观察曲面的倾斜度确定两者对响应值的影响程度, 倾斜度越高, 即坡度越陡, 说明两者交互作用越显著。另外, 从 3D 图的颜色可以做一个初步判定, 随着变化趋势的剧烈增加, 其颜色也呈加深趋势。并且等高线的形状也可反映出交互效应的强弱。因此从图 3 可以看出炖制时间与干燥温度、干燥时间的交互作用明显。而干燥温度与干燥时间两者交互效应并不明显。从等高线图中可以看出干燥温度对综合得分的影响要大于炖制和干燥时间对综合得分的影响。

因此, 以综合得分最大值为指标, 使炖制时间、

干燥温度和干燥时间在响应范围内, 地黄苷 D、益母草苷和毛蕊花糖苷含量以最大值为响应值, 同时使 5-HMF 含量在响应范围内, 最后得到酒炖熟地黄的工艺条件为 100 kg 生地黄加入黄酒 60 kg, 浸润 12 h, 密闭炖制 37.95 h, 在 75.85 °C 干燥 32.40 h, 此时地黄苷 D、益母草苷、5-HMF、毛蕊花糖苷和综合得分的预测值分别为 32.579 3、0.701 027、1.077 65、0.068 314 mg/g 及 0.853 363。

此外结合单因素实验和实际生产考虑, 酒炖地黄的工艺条件可为 100 kg 生地黄加入黄酒 60 kg, 浸润 12 h, 密闭炖制 38 h, 在 76 °C 干燥 33 h, 则

可达到炮制要求。

**2.3.4 验证实验** 根据优选出的最佳工艺平行制备酒炖熟地黄 3 份, 分别按照上述实验条件进行分析检测, 实验结果见表 7。酒炖熟地黄工艺验证结果

平均综合得分为 0.855 4 与模型预测值 (0.853 363) 相近, 且相对误差均小于 5%, 表明建立的工艺模型具有较好的预测性, 优选的炮制工艺合理, 对实际生产具有指导意义。

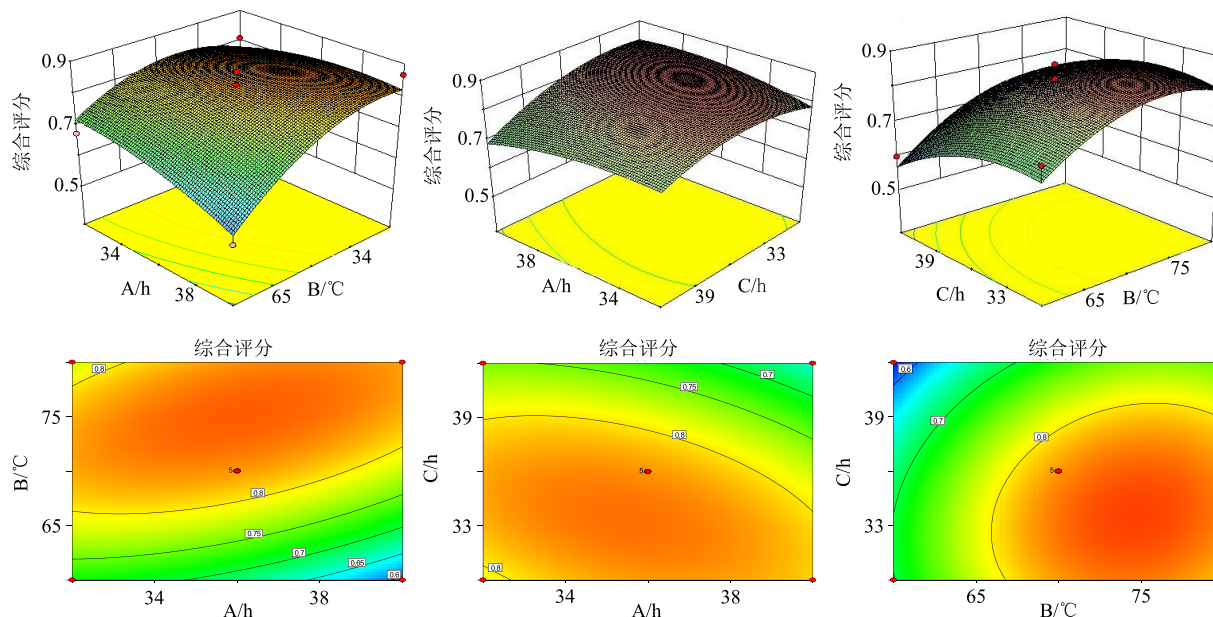


图 3 炖制时间 (A)、干燥温度 (B) 和干燥时间 (C) 的交互作用

Fig. 3 Interaction among stewing time (A), drying temperature (B), and drying time (C)

表 7 工艺验证结果

Table 7 Results of process verification

| 试验号 | 地黄苷 D/(mg·g <sup>-1</sup> ) | 益母草苷/(mg·g <sup>-1</sup> ) | 5-HMF/(mg·g <sup>-1</sup> ) | 毛蕊花糖苷/(mg·g <sup>-1</sup> ) | 综合评价    |
|-----|-----------------------------|----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|---------|
| 1   | 32.513 3                    | 0.692 3                    | 0.985 2                     | 0.069 6                     | 0.852 8 |
| 2   | 32.357 6                    | 0.680 4                    | 1.101 4                     | 0.071 0                     | 0.860 4 |
| 2   | 32.493 5                    | 0.685 1                    | 1.000 1                     | 0.070 1                     | 0.852 9 |

### 3 讨论

中药炮制终点的确认与量化是近代中药研究者的重要任务, 中药的多成分, 多靶点, 多来源一直是限制其发展的因素, 本实验就酒炖熟地黄炮制工艺的影响因素, 应用响应曲面法展开工艺性探讨, 着重建立了迄今为止熟地黄常用且稳定的 4 种化学指标的 HPLC 方法, 从多个指标变化综合评价的角度分析熟地黄在现代科学技术下的发展, 本实验所建立的工艺稳定可行, 响应模型拟合度较好, 达到工艺优化的目的。

#### 3.1 响应曲面法

RSM<sup>[14]</sup>是一种优化生物过程的统计学试验设计, 采用该法以建立连续变量曲面模型, 对影响生物过程的因子及其交互作用进行评价, 确定最佳水平范围, 实验模拟性强, 并且所需要的试验组数<sup>[15]</sup>

相对较少, 可节省人力物力, 因此该方法已经成功应用于各种各样的生物过程优化中。

#### 3.2 化学指标性成分的选择和 HPLC 方法的建立

目前熟地黄研究文献中有效化学成分就集中于梓醇、地黄苷 D、益母草苷、5-HMF 和毛蕊花糖苷 5 种成分, 本实验前期尝试进行 5 种成分的混标定量测定方法的建立, 但是由于梓醇特殊的极性要求和各个化学成分的特点, 均未成功, 接下来将着重进行其指纹图谱的建立。

#### 3.3 综合评价权重的选择

地黄苷 D、益母草苷、5-HMF 和毛蕊花糖苷 4 种成分, 根据其化学和药理特性进行权重分配<sup>[22]</sup>。地黄苷 D 的水溶性好、热稳定强, 在生地黄和熟地黄中含量较高, 地黄中益母草苷和梓醇的极性较为接近, 同时在加工炮制过程中几乎不分解, 现在大

多数学者都将其作为质量控制的标志物；其含量仅次于梓醇、地黄苷 A 和地黄苷 D；此外益母草苷具有抗炎、保护心脏等生物活性。毛蕊花糖苷，又名麦角甾苷，是《中国药典》2015 年版中熟地黄质量控制的唯一指标性成分，化学性质稳定。现代药理学研究证实，毛蕊花糖苷具有滋阴补肾、降血糖、调血脂、抗衰老和抗肿瘤等作用<sup>[23-24]</sup>；5-HMF 是炮制成熟地的过程中新产生的一种物质，在地黄炮制过程中，5-HMF 含量增加 20 倍左右。

另外对 5-HMF 是毒性成分还是特殊的活性成分，一直有争议，一些研究认为，5-HMF 对眼黏膜、上呼吸道黏膜等产生刺激作用，对人体横纹肌和内脏有损伤；但近年来的 5-HMF 的生物活性逐渐被发掘，具有抗心肌缺血、抗氧化、降血糖、改变血液流变性和神经保护性<sup>[25]</sup>。同时，5-HMF 作为美拉德反应的研究热点一直被关注<sup>[26-27]</sup>。鉴于其在炮制过程中一直增加的趋势，故其权重为 10%，其余 3 种成分均为 30%。

### 3.4 单因素范围的确定

古法炮制熟地黄为“九蒸九晒”，依据此法，现代对其进行炮制，使其达到同古法相同的成品程度，故本实验在各个因素的选择时在参考文献的基础上，结合古法和现代时间标准，进行范围性考察，力求所选范围有效、科学。

### 3.5 各个指标的响应模型结果

地黄苷 D =  $-249.183\ 31 + 12.123\ 07\ A - 1.202\ 3\ B + 5.304\ 87\ C - 1.75 \times 10^{-3}\ AB - 0.033\ 587\ AC + 4.40 \times 10^{-3}\ BC - 0.146\ 26\ A^2 + 9.33 \times 10^{-3}\ B^2 - 0.063\ 384\ C^2$ ,  $F=9.5$ ,  $P=0.003\ 6 < 0.05$ , 表明 2 次多元回归模型显著，而模型决定系数  $R^2=0.924\ 3$ ,  $R_{adj}^2=0.827\ 0$ ,  $CV=3.67\%$ , 表明模型拟合较好；益母草苷 =  $6.227\ 38 - 0.518\ 44\ A - 0.059\ 525\ B + 0.342\ 03\ C + 4.51 \times 10^{-3}\ AB - 5.97 \times 10^{-3}\ AC + 4.27 \times 10^{-4}\ BC + 5.61 \times 10^{-3}\ A^2 - 8.27 \times 10^{-4}\ B^2 - 2.32 \times 10^{-3}\ C^2$ ,  $F=3.77$ ,  $P=0.047\ 1 < 0.05$ , 表明 2 次多元回归模型显著而模型决定系数  $R^2=0.828\ 9$ ,  $R_{adj}^2=0.608\ 9$ ,  $CV=17.44\%$ , 表明模型拟合较好；5-HMF =  $-6.589\ 92 + 0.236\ 82\ A - 0.150\ 04\ B + 0.427\ 93\ C + 1.42 \times 10^{-3}\ AB - 1.95 \times 10^{-3}\ AC + 7.58 \times 10^{-5}\ BC - 3.47 \times 10^{-3}\ A^2 + 7.93 \times 10^{-4}\ B^2 - 0.005\ C^2$ ,  $F=8.15$ ,  $P=0.005\ 7 < 0.05$ , 表明 2 次多元回归模型显著，而模型决定系数  $r^2=0.912\ 9$ ,  $R_{adj}^2=0.800\ 9$ ,  $CV=8.17\%$ , 表明模型拟合较好。但是  $F_{失拟}=69.06$ ,

$P=0.000\ 7 < 0.05$ , 失拟度显著，表明以 5-HMF 为指标，不适合进行响应曲面设计；毛蕊花糖苷 =  $-1.306\ 06 + 0.042\ 088\ A + 0.030\ 177\ B - 0.023\ 863\ C - 1.79 \times 10^{-4}\ AB + 3.52 \times 10^{-4}\ AC + 2.38 \times 10^{-5}\ BC - 6.03 \times 10^{-4}\ A^2 - 1.68 \times 10^{-4}\ B^2 + 1.18 \times 10^{-4}\ C^2$ ,  $F=3.89$ ,  $P=0.043\ 6 > 0.05$ , 表明 2 次多元回归模型不显著，模型拟合度不好。综上所述，进行综合评分具有十分必要的意义。

### 参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 四部. 2015.
- [2] 杜珂, 高晓霞, 王锋, 等. 基于药效物质基础的熟地黄质-效评价研究进展 [J]. 中草药, 2019, 50(6): 1477-1484.
- [3] 李红伟, 孟祥乐. 地黄化学成分及其药理作用研究进展 [J]. 药物评价研究, 2015, 38(2): 218-228.
- [4] 张文婷, 岳超, 黄琴伟, 等. 地黄生品与炮制品中 8 个糖类成分及不同炮制时间点其量变化分析 [J]. 中草药, 2016, 47(7): 1132-1136.
- [5] 沈华旦, 方江济, 郭鹏程, 等. 基于 HPLC-UV-DPPH 法的地黄和熟地黄药材抗氧化活性成分比较研究 [J]. 中草药, 2018, 49(3): 582-588.
- [6] 孙思邈. 备急千金要方 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2011.
- [7] 陶弘景. 本草经集注 [M]. 北京: 学苑出版社, 2013.
- [8] 雷斅. 雷公炮炙论 [M]. 上海: 上海中医学院出版社, 1986.
- [9] 许叔微. 普济万事方 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2015.
- [10] 史堪. 史载之方 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2003.
- [11] 孟祥龙, 马俊楠, 张朔生, 等. 熟地黄炮制 (九蒸九晒) 过程中药效化学成分变化及炮制辅料对其影响研究 [J]. 中草药, 2016, 47(5): 752-759.
- [12] 岳超, 高杰, 石上梅, 等. HPLC 测定地黄炮制前后 3 种苷类物质的含量 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(4): 71-74.
- [13] Meng X L, He M J, Guo R, et al. Investigation of the effect of the degree of processing of *Radix Rehmanniae Preparata* (Shu Dihuang) on Shu Dihuangtan carbonization preparation technology [J]. *Molecules*, 2017, doi: 10.3390/molecules22071193.
- [14] 张静, 马瑛. 多指标综合平衡法-正交试验优化九蒸九晒地黄炮制工艺 [J]. 中国药房, 2016, 27(7): 962-965.
- [15] 赵丹, 张振凌, 韩宁宁, 等. 酒炖炮制时间对熟地黄质量的影响 [J]. 中医学报, 2017, 32(7): 1231-1235.
- [16] 尚伟庆, 贺清辉, 张建军. 地黄炮制过程中毛蕊花糖苷

- 变化的研究 [J]. 新中医, 2014, 46(5): 209-211.
- [17] 董金石. 地黄的炮制对 5-羟甲基糠醛含量的影响 [J]. 黑龙江科技信息, 2017, 38(7): 38.
- [18] 钟 恋, 汪云伟, 杨诗龙, 等. 地黄酒炖过程化学成分及“味”的关系 [J]. 中成药, 2015, 37(5): 1041-1044.
- [19] 钟 恋. 基于“性状”和化学成分的清蒸九制地黄过程研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2015.
- [20] 肖井雷, 刘玉翠, 刘媛媛, 等. 熟大黄炮制工艺优选及判定标准量化研究 [J]. 中草药, 2017, 48(8): 1571-1576.
- [21] 王协和, 夏林丽, 呼 梅, 等. Box-Behnken 响应曲面结合多指标综合评分法优选通脉复方提取工艺 [J]. 中国医院药学杂志, 2017, 37(8): 712-716.
- [22] 王 勃, 吕辰子, 何美菁, 等. 熟地黄炮制的研究进展 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2018, 20(6): 1010-1017.
- [23] Alipieva K, Korkina L, Orhan I E, *et al.* Verbascoside—A review of its occurrence, (bio) synthesis and pharmacological significance [J]. *Biotechnol Adv*, 2014, 32(6): 1065-1076.
- [24] 尚泰宇. 地黄毛蕊花糖苷功能分析 [J]. 科技经济导刊, 2018, 26(14): 113.
- [25] 耿 放, 王喜军. 5-羟甲基-2-糠醛 (5-HMF) 在中药复方中的研究现状及相关药效探讨 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2005, 7(6): 52-56.
- [26] Kambo N, Pandey S, Upadhyay S K. Hydrotropic enhancement of rate of the browning reaction: A kinetic study [J]. *J Disp Sci Tech*, 2006, 27(8): 1113-1118.
- [27] Won T H, Liao L, Kang S S, *et al.* Simultaneous analysis of furfural metabolites from *Rehmanniae Radix Preparata* by HPLC-DAD-ESI-MS [J]. *Food Chem*, 2014, 142(6): 107-113.