

## 多指标一测多评-响应曲面法优选蜜炙甘草的最佳炮制工艺

段秀俊, 刘培, 叶花, 王科, 张莉丹, 王伊楠, 董征艳, 王鹏飞

山西中医药大学中药学院, 山西 晋中 030619

**摘要:** 目的 基于响应曲面法, 应用 HPLC 法定量测定, 从多指标一测多评、综合评价的角度建立蜜炙甘草的最佳炮制工艺。方法 采用 HPLC 定量分析, 以甘草苷、甘草素、甘草查耳酮 A 和甘草次酸的含量作为考察指标; 采用响应曲面设计法考察甘草加蜜量、浸泡焖润时间、炒制温度、炒制时间对蜜炙甘草炮制工艺的影响, 优选出蜜炙甘草最佳炮制工艺。结果 色谱柱为 Diamonsil C<sub>18</sub> (2) (200 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-0.1%磷酸水溶液, 梯度洗脱: 0~20 min, 12%~32%乙腈; 20~45 min, 32%~70%乙腈; 45~75 min, 70%~97%乙腈; 检测波长 260 nm, 柱温 20 °C, 体积流量 1 mL/min; 以甘草苷为内标物, 测定并计算得到甘草素、甘草查耳酮 A、甘草次酸与甘草苷的相对校正因子分别为 0.56、0.64、1.42; 优选的蜜炙甘草最佳炮制工艺为加蜜量 1/4, 浸泡焖润时间 15 min, 炒制锅底温度为 160 °C, 炒制时间 13 min。结论 该实验含量测定方法学考察结果符合要求, 采用响应曲面法优选的蜜炙甘草的最佳炮制方案是可行的, 为制定蜜炙甘草的质量标准和现代研究提供了科学依据。

**关键词:** 蜜炙甘草; HPLC; 一测多评法; 炮制工艺; 响应曲面法; 甘草苷; 甘草素; 甘草查耳酮 A; 甘草次酸

**中图分类号:** R283.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2020)02-0364-08

**DOI:** 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.02.012

## Optimization of best processing technology of *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma Praeparata cum Melle* by multi-index QAMS-response surface methodology

DUAN Xiu-jun, LIU Pei, YE Hua, WANG Ke, ZHANG Li-dan, WANG Yi-nan, DONG Zheng-yan, WANG Peng-fei

School of Chinese Materia Medica, Shanxi University of Chinese Medicine, Jinzhong 030619, China

**Abstract: Objective** Based on response surface methodology, HPLC was applied to quantitatively determine the optimal processing technology of *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma Praeparata cum Melle* (GRRPM) from the perspective of multi-index and comprehensive evaluation. **Methods** HPLC was used for quantitative analysis, and the content of liquiritin, liquiritigenin, licochalcone A and glycyrrhetic acid was used as inspection indexes. Response surface methodology was used to investigate the effects of the adding amount of honey, steaming and soaking time, frying temperature and frying time on the processing technology of GRRPM, and to optimize the optimal processing technology of GRRPM. **Results** The chromatographic column was Diamonsil C<sub>18</sub> (2) (4.6 mm × 200 mm, 5 μm); mobile phase was acetonitrile-0.1% phosphate aqueous solution, gradient eluting: 0—20 min, 12%—32% acetonitrile; 20—45 min, 32%—70% acetonitrile; 45—75 min, 70%—97% acetonitrile, with detection wavelength of 260 nm, column temperature of 20 °C, and flow rate of 1 mL/min; Using liquiritin as internal standard, the relative correction factors of glycyrrhizin, licochalcone A, glycyrrhizic acid and their relative correction factors were determined and calculated to be 0.56, 0.64 and 1.42, respectively. The optimum processing process of GRRPM was as follows: the amount of honey was 1/4, the soaking time was 15 min, frying pan bottom temperature was 160 °C, and frying time was 13 min. **Conclusion** The results of systematic adaptability investigation of the experimental content determination method meet the requirements. The best processing scheme of GRRPM optimized by response surface methodology is feasible and provides scientific basis for formulating quality standards and modern research of GRRPM.

**Key words:** *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma Praeparata cum Melle*; HPLC; quantitative analysis of multi-components by single marker (QAMS); processing technology; response surface methodology; liquiritin; glycyrrhizin; licochalcone A; glycyrrhetic acid

收稿日期: 2019-07-12

基金项目: 山西省基础研究项目 (2013011048-6); 山西中医药大学科技创新能力培养计划项目 (2019PY-117)

作者简介: 段秀俊, 硕士生导师, 副教授, 从事中药新剂型、新技术、新工艺研究。Tel/Fax: (0351)3179903 E-mail: dxjzhyxy@163.com

甘草来源于豆科甘草属植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch.、光果甘草 *G. glabra* L. 或胀果甘草 *G. inflata* Bat. 的干燥根和根茎<sup>[1]</sup>。甘草药用历史悠久，是临床应用最广的传统中药之一，素有“十方九草”之称，“医圣”张仲景《伤寒论》共载方剂 113 首，含甘草的方剂约有 70 首<sup>[2]</sup>。历史上至少出现过 30 种甘草炮制方法，根据文献记载首次用蜜作为辅料炮制甘草的是唐·《千金翼方》，谓“蜜煎甘草，涂之即瘥”；宋·《太平惠民和剂局方》始有“蜜炒”；至明清时期，蜜炙法成为甘草炮制的主要方法，《中国药典》2015 年版甘草项下只载有蜜炙一种炮制品种<sup>[3]</sup>。甘草生品味甘偏凉，长于泻火解毒、化痰止咳。蜜炙甘草甘温，以补脾和胃、益气复脉力胜<sup>[1]</sup>。

到目前为止有关蜜炙甘草研究较多的是与生品成分的比较，对蜜炙工艺参数研究报道较少，有学者曾采用均匀设计法或正交试验法对甘草蜜炙的工艺参数进行了考察<sup>[4-5]</sup>，但考察指标为 1~2 个指标成分，难以较为全面地从化学成分的角度更为客观地评价蜜炙工艺参数，且此 2 种方法均无法直观看出因素之间的交互作用情况，为此本实验采用响应曲面法 (response surface methodology, RSM) 考察甘草蜜炙的工艺条件，在优选工艺参数的同时，重视交互作用的影响，且考察指标涉及到二氢黄酮类的甘草苷及甘草素、查耳酮类的甘草查耳酮 A 和皂苷类的甘草次酸 4 种成分，实验结果的说服力更强。同时，在《中国药典》2015 年版炙甘草参照通则 0213 项下蜜炙法规定：“蜜炙时，应先将炼蜜加适量沸水稀释后，加入待炮炙品中拌匀，闷透，置炒制容器内，用文火炒至规定程度时，取出，放凉”<sup>[1]</sup>。所以，本实验以优化蜜炙甘草炮制工艺为目标，采用响应曲面法-一测多评多指标量化炙甘草最佳炮制工艺，为制定炙甘草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

Waters 2695 高效液相色谱仪，Waters 2998 检测器，Empower 色谱工作站，美国沃特世公司；ATY224 万分之一型天平，日本岛津公司；AB135-S 十万分之一电子天平，瑞士 Mettler 公司；GZX-9076 MBE 型电热恒温鼓风干燥箱，上海博讯实业有限公司医疗设备厂；KQ5200V 型超声波清洗器，昆山市超声仪器有效公司。

## 1.2 材料

甘草购自河北全泰药业有限公司，由山西中医药大学中药鉴定学裴香萍副教授鉴定来源于豆科甘草属植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根和根茎制成的饮片。

对照品甘草苷 (批号 111610-201607) 购自中国食品药品检定研究院，对照品甘草素 (批号 171016)、甘草查耳酮 A (批号 171109)、甘草次酸 (批号 170910) 购自上海融禾医药科技有限公司，各对照品质量分数均  $\geq 98\%$ 。

乙腈，色谱纯，批号 20180301，购自美国 Oceanpak 公司；磷酸，分析纯，批号 20170408，购自天津市科密欧化学试剂有限公司；水为娃哈哈纯净水；95%乙醇，分析纯，批号 20170309，购自天津市科密欧化学试剂有限公司。

## 2 方法与结果

### 2.1 蜜炙甘草的制备

按照《中国药典》2015 年版蜜炙法通则 0213 方法进行。取生甘草饮片，大小分档，先将炼蜜加适量沸水稀释后，加入待炮炙品中拌匀，闷透，置炒制容器内，用文火炒至规定程度时，取出，放凉，得到蜜炙甘草样品。

### 2.2 多指标一测多评含量测定方法的建立及综合评价指标确定

**2.2.1 色谱条件** 色谱柱为 Diamonsil C<sub>18</sub> 柱 (200 mm × 4.6 mm, 5 μm)，流动相为乙腈-0.1%磷酸水溶液，梯度洗脱：0~20 min, 12%~32%乙腈；20~45 min, 32%~70%乙腈；45~75 min, 70%~97%乙腈；检测波长 260 nm，柱温 20 °C，该条件下各组分分离度良好 ( $R > 1.5$ )，典型色谱图见图 1。

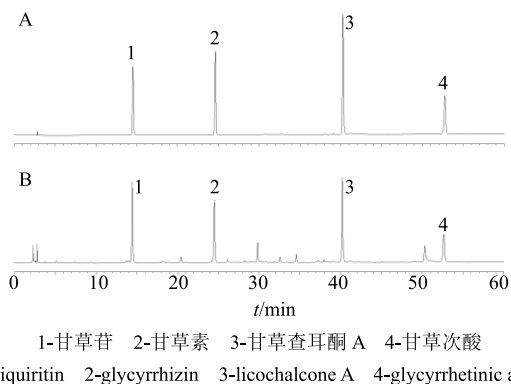


图 1 混合对照品溶液 (A) 及炙甘草供试品溶液 (B) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC chromatogram of mixed reference substances (A) and sample solution of GRRPM (B)

**2.2.2 对照品溶液的制备** 精密称取对照品甘草苷、甘草素、甘草查耳酮 A 和甘草次酸各适量,置于同一 25 mL 量瓶中,加 70%乙醇定容至刻度,即得混合对照品母液(各成分质量浓度分别为 0.410、0.440、0.450、0.425 mg/mL);精密量取混合对照品母液 2 mL,于 10 mL 量瓶中,加 70%乙醇定容至刻度,即得混合对照品溶液(质量浓度分别为 0.082、0.088、0.090、0.085 mg/mL)。

**2.2.3 供试品溶液的制备** 精密称取蜜炙甘草各样品粉末(过三号筛)约 0.2 g,置 250 mL 具塞锥形瓶中,精密加入 70%乙醇 100 mL,密塞并称定质量。超声处理(功率 250 W,频率 40 kHz) 30 min,放冷,擦干,再称定质量,用 70%乙醇补足失去的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得供试品溶液。

**2.2.4 线性关系考察** 精密吸取混合对照品溶液 0.2、0.4、0.8、1.2、1.6、2.0 mL 各置于 1 个 2 mL 量瓶中,加 70%乙醇定容至刻度,摇匀。分别吸取对照品溶液各 10  $\mu$ L,按“2.2.1”项下色谱条件进样,记录峰面积值。将所得峰面积( $Y$ )与各对照品的质量浓度( $X$ )进行线性回归,得回归方程、相关系数( $r$ )及线性范围分别为甘草苷  $Y=619\ 061 X-1\ 451.8$ ,  $r=0.999\ 9$ ,  $0.082\sim 0.820\ \mu\text{g}$ ;甘草素  $Y=933\ 484 X-10\ 804$ ,  $r=0.999\ 8$ ,  $0.088\sim 0.880\ \mu\text{g}$ ;甘草查耳酮 A  $Y=862\ 605 X-4\ 464.8$ ,  $r=0.999\ 8$ ,  $0.090\sim 0.900\ \mu\text{g}$ ;甘草次酸  $Y=134\ 647 X+82\ 388$ ,  $r=0.999\ 9$ ,  $0.085\sim 0.850\ \mu\text{g}$ 。

**2.2.5 精密度试验** 取“2.2.2”项下混合对照品溶液 10  $\mu$ L,按“2.2.1”项下色谱条件进样,连续进样 6 次,记录峰面积值,并计算 RSD,甘草苷峰面积 RSD 值为 0.65%,甘草素峰面积 RSD 值为 0.93%,甘草查耳酮 A 峰面积 RSD 值为 0.96%,甘草次酸峰面积 RSD 值为 0.92%,说明该仪器精密度良好。

**2.2.6 稳定性试验** 于 1、2、4、8、16、24 h 精密吸取按“2.3.3”项下炒制温度 250  $^{\circ}\text{C}$  得到的样品制备的供试品溶液 10  $\mu$ L,按“2.2.1”项下色谱条件进样分析,记录峰面积值,计算 RSD 值,得到甘草苷峰面积 RSD 值为 1.82%,甘草素峰面积 RSD 值为 2.55%,甘草查耳酮 A 峰面积 RSD 值为 2.72%,甘草次酸峰面积 RSD 值为 2.05%,说明供试品溶液在 24 h 内具有较好的稳定性。

**2.2.7 重复性试验** 取炙甘草粉末(“2.3.3”项下,炒制温度 250  $^{\circ}\text{C}$  得到的样品) 6 份,每份约 0.2 g,精密称定,按“2.2.3”项下方法制备得供试品溶液,

按“2.2.1”项下色谱条件进样,记录峰面积值,计算质量分数的 RSD 值,甘草苷为 1.31%,甘草素为 1.56%,甘草查耳酮 A 为 1.84%,甘草次酸为 1.31%,说明该方法重复性良好。

**2.2.8 加样回收率试验** 称取已测定各指标成分量的炙甘草粉末(“2.3.3”项下,炒制温度 250  $^{\circ}\text{C}$  得到的样品) 9 份,每份约 0.1 g,精密称定,分别按样品含有量的 0.5、1.0、1.5 倍加入甘草苷(分别加入甘草苷对照品母液 1.2、2.4、3.7 mL)、甘草素(分别加入甘草素对照品母液 1.1、2.3、3.4 mL)、甘草查耳酮 A(分别加入甘草查耳酮 A 对照品母液 1.1、2.2、3.3 mL)和甘草次酸(分别加入甘草次酸对照品母液 1.2、2.4、3.5 mL)对照品,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,按“2.2.1”项下色谱条件进样,记录峰面积值,计算回收率以及 RSD 值,甘草苷平均回收率为 100.91%,RSD 为 1.31%,甘草素平均回收率为 100.15%,RSD 为 1.45%,甘草查耳酮 A 平均回收率为 100.72%,RSD 为 2.18%,甘草次酸平均回收率为 100.28%,RSD 为 2.23%,说明该方法具有良好的准确度。

**2.2.9 相对校正因子( $f_{m/k}$ )计算** 分别精密吸取混合对照品溶液 5、10、15  $\mu$ L,按“2.2.1”项下色谱条件进样。以甘草苷为内标物质,按公式  $f_{m/k} = A_k C_m / A_m C_k$  ( $A_k$  为内标物峰面积,  $C_k$  为内标物质量浓度,  $A_m$  为其他组分  $m$  的峰面积,  $C_m$  为其他组分  $m$  的质量浓度),分别计算甘草素、甘草查耳酮 A 及甘草次酸对甘草苷的  $f_{m/k}$ ,分别记为  $f_{\text{甘草素/甘草苷}}$ 、 $f_{\text{甘草查耳酮 A/甘草苷}}$ 、 $f_{\text{甘草次酸/甘草苷}}$ ,结果见表 1。

**2.2.10 样品测定** 精密称取单因素及 RSM 试验的样品,按照“2.2.3”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平均含量。

**2.2.11 综合评价指标** 采用多指标一测多评-RSM 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( $Z$ ) = 甘草

表 1 蜜炙甘草中 3 种指标成分对甘草苷的  $f_{m/k}$

Table 1  $f_{m/k}$  of liquiritin in three kinds of index component of GRRPM

进样体积/ $\mu$ L	$f_{\text{甘草素/甘草苷}}$	$f_{\text{甘草查耳酮 A/甘草苷}}$	$f_{\text{甘草次酸/甘草苷}}$
5	0.53	0.61	1.35
10	0.57	0.64	1.43
15	0.59	0.66	1.47
均值	0.56	0.64	1.42

苷得分×25%+甘草素得分×25%+甘草查耳酮 A 得分×25%+甘草次酸得分×25%。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 RSM 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。

实验采用  $f_{m/k}$  法计算样品中甘草苷、甘草素、甘草查耳酮 A、甘草次酸含有量,以甘草苷内标,计算公式如下。

$$\text{样品中含有量} = f_{m/k} \times A_m \times C_k / A_k \times 100 / W$$

$f_{m/k}$  为各组分相对校正因子,  $A_m$  为其他组分  $m$  的峰面积,  $A_k$  为内标物峰面积,  $C_k$  为内标物浓度,  $W$  为样品称样量

### 2.3 蜜炙甘草影响因素的单因素实验

**2.3.1 加蜜量的考察** 分别取药材量 1/1、1/3、1/4、1/5、1/6、1/7 的炼蜜,加适量开水稀释,各加入到 10 g 净甘草片中拌匀,浸泡焖润 20 min,置炒制容

器中 200 °C 炒 10 min,取出,烘干,放凉,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,按“2.2.1”项下色谱条件进样,计算样品中 4 种成分含有量,并进行综合评分,结果见表 2。随着加蜜量的降低,综合评分值呈上升趋势,当加蜜量达到 1/4 时综合评分值趋于平缓,实验初定加蜜量为 1/4。

**2.3.2 浸泡焖润时间** 取净甘草片 5 份,每份 10 g,各加 1/4 炼蜜的开水稀释液,分别浸泡焖润 5、10、15、20、25 min,并置炒制容器内以 200 °C 炒制 10 min,取出,烘干,放凉,按“2.2.3”项下方法制备得供试品溶液,按“2.2.1”项下色谱条件进样,计算样品中 4 种成分含有量,并进行综合评分,结果见表 3。随着浸泡焖润时间的增加,炙甘草的综合评分值变化趋势平缓,响应曲面实验不将其列为考察指标,实验选择焖润时间为 20 min。

表 2 不同加蜜量下指标成分的含量及综合评分

Table 2 Content and comprehensive score of index components under different honey addition

加蜜倍数/倍	称样量/g	样品中含有量/mg				综合评分
		甘草苷	甘草素	甘草查耳酮 A	甘草次酸	
1/1	0.201 4	9.78	0.85	0.93	14.23	0.888 5
1/3	0.200 1	9.08	1.13	0.87	14.06	0.927 2
1/4	0.202 7	9.12	1.05	1.11	14.67	0.960 3
1/5	0.199 1	9.66	1.01	1.09	14.84	0.968 0
1/6	0.200 5	9.28	1.07	1.12	14.37	0.968 3
1/7	0.200 3	9.32	1.08	1.1	14.59	0.968 5

表 3 不同浸泡焖润时间下指标成分的含量及综合评分

Table 3 Content and comprehensive score of index components under different soaking and steaming time

焖润时间/min	称样量/g	样品中含有量/mg				综合评分
		甘草苷	甘草素	甘草查耳酮 A	甘草次酸	
5	0.200 7	8.87	1.02	1.05	14.13	0.954 0
10	0.201 0	8.87	1.02	1.05	14.13	0.953 9
15	0.201 4	8.97	0.97	1.07	14.04	0.954 0
20	0.200 6	8.97	1.14	0.92	14.01	0.954 0
25	0.203 3	8.99	1.17	0.87	14.15	0.954 0

**2.3.3 炒制温度** 取净甘草片 5 份,每份 10 g,各加 1/4 炼蜜的开水稀释液,分别浸泡焖润 20 min,置炒制容器内各以 50、100、150、200、250 °C 炒至药材表面深黄色,取出,烘干,放凉,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,按“2.2.1”项下色谱条件进样,计算样品中 4 种成分含有量,并进行综合评分,结果见表 4。随着炒制温度的增加,综合评分值呈上升趋势,当炒制温度达 150 °C 时,综合评

分值趋于平缓,实验初定炒制温度为 150 °C。

**2.3.4 炒制时间** 取净甘草片 5 份,每份 10 g,各加 1/4 炼蜜的开水稀释液,分别浸泡焖润 20 min,置炒制容器内各以 150 °C 分别炒制 2.5、5.0、7.5、10.0、12.5 min,取出,烘干,放凉,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,按“2.2.1”项下色谱条件进样,计算样品中 4 种成分含有量,并进行综合评分,结果见表 5。随着炒制时间的增加,综合评分

表 4 不同炒制温度下指标成分的含量及综合评分

Table 4 Content and comprehensive score of index components under different frying temperatures

炒制温度/℃	称样量/g	样品中含有量/mg				综合评分
		甘草苷	甘草素	甘草查耳酮 A	甘草次酸	
50	0.200 9	9.34	1.08	1.09	14.09	0.954 9
100	0.200 4	9.56	1.05	1.05	14.12	0.965 7
150	0.201 0	9.63	1.11	1.14	13.98	0.977 5
200	0.200 9	9.66	1.11	1.18	13.28	0.983 2
250	0.199 4	9.74	1.15	1.13	13.21	0.984 4

值呈现上升趋势,当炒制时间达到 7.5 min 时,综合评分值趋于平缓,实验初定炒制时间为 7.5 min。

2.4 RSM 实验

2.4.1 实验设计与结果 实验采用 RSM<sup>[6]</sup>优选蜜炙甘草的最佳工艺参数,根据单因素实验结果,实验选择对蜜炙甘草质量影响比较明显的加蜜量(A)、炒制时间(B)、炒制温度(C)作为考察因素,进行 3 因素 3 水平 Box-Behnken 试验设计,以甘草苷、甘草素、甘草查耳酮 A、甘草次酸的综合评分值(Y,权重系数均为 0.25)为考察指标,优化蜜炙甘草的炮制工艺。因素水平表及实验结果见表 6。

2.4.2 方差分析 应用 Design-Expert V8.0.6 软件对表 6 数据进行多元回归拟合及显著性检验,结果见表 7。因素 A、B、C 与综合评分 Y 之间的 2 次多

项回归方程  $Y=94.14+2.40 A+1.93 B+0.55 C+0.68 AB-1.82 AC+3.15 BC-1.02 A^2-2.22 B^2-4.31 C^2$ ,  $r=0.977 0$ ,说明该模型对实验实际情况拟合良好,实验误差较小。因素 A、B、BC、B<sup>2</sup>、C<sup>2</sup>( $P<0.01$ )对炙甘草炮制综合评分的线性效应均极显著,因素 AC( $P<0.05$ )对炙甘草炮制工艺综合评分的曲面效应显著。

2.4.3 响应曲面分析 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。等高线的形状反映出交互效应的强弱大小,两因素交互作用显著则等高线为椭圆形,相反为圆形。

表 5 不同炒制时间下指标成分的含量及综合评分

Table 5 Content and comprehensive score of index components under different frying time

炒制时间/min	称样量/g	样品中含有量/mg				综合评分
		甘草苷	甘草素	甘草查耳酮 A	甘草次酸	
2.5	0.201 3	9.56	0.87	1.15	14.06	0.928 3
5.0	0.201 2	9.43	1.11	1.01	14.58	0.947 5
7.5	0.199 6	9.67	1.09	1.09	14.35	0.965 8
10.0	0.199 5	8.99	1.18	1.12	14.01	0.978 5
12.5	0.199 5	9.56	1.12	1.12	14.64	0.979 0

表 6 响应曲面法实验结果

Table 6 Experimental results of RSM

序号	A/倍	B/min	C/℃	Y	序号	A/倍	B/min	C/℃	Y	序号	A/倍	B/min	C/℃	Y
1	1/4 (+1)	15 (+1)	160 (0)	94.50	7	1/6 (0)	15 (+1)	80 (-1)	86.31	13	1/8 (-1)	15 (+1)	160 (0)	90.36
2	1/6 (0)	15 (+1)	240 (+1)	93.60	8	1/6 (0)	10 (0)	160 (0)	94.41	14	1/8 (-1)	10 (0)	240 (+1)	87.84
3	1/6 (0)	10 (0)	160 (0)	94.32	9	1/4 (+1)	10 (0)	80 (-1)	93.42	15	1/6 (0)	10 (0)	160 (0)	93.69
4	1/4 (+1)	10 (0)	240 (+1)	90.99	10	1/8 (-1)	10 (0)	80 (-1)	82.98	16	1/4 (+1)	5 (-1)	160 (0)	90.09
5	1/8 (-1)	5 (-1)	160 (0)	88.65	11	1/6 (0)	5 (-1)	80 (-1)	87.93	17	1/6 (0)	10 (0)	160 (0)	93.15
6	1/6 (0)	5 (-1)	240 (+1)	82.62	12	1/6 (0)	10 (0)	160 (0)	95.13					

表 7 响应面回归模型的方差分析

Table 7 Variance analysis of RSM regression model

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	244.63	9	27.18	16.37	0.000 7	C <sup>2</sup>	78.17	1	78.17	47.07	0.000 2
A	45.94	1	45.94	27.66	0.001 2	残差	11.63	7	1.66		
B	29.95	1	29.95	18.04	0.003 8	失拟项	9.36	3	3.12	5.50	0.066 5
AC	13.29	1	13.29	8.00	0.025 5	纯误差	2.27	4	0.57		
BC	39.69	1	39.69	23.90	0.001 8	总和	256.25	16			
B <sup>2</sup>	20.68	1	20.68	12.45	0.009 6						

$P < 0.05$  表明差异显著

$P < 0.05$ , indicating significant difference

由图 2 可知炒制时间 (B) 与炒制温度 (C)、加蜜倍数 (A) 与炒制温度 (C) 交互影响对炙甘草炮制综合评分均影响显著且前者影响更大。炒制时间 (B) 与炒制温度 (C) 响应曲面三维图更陡峭。

通过软件对模型极值求解和分析等高线得到最佳炙甘草炮制条件为加蜜倍数 1 : 3.7, 炒制时间 13.26 min, 炒制温度 160.97 °C, 预测炙甘草炮制综合评分为 96.42。

结合单因素实验和实际生产考虑, 蜜炙甘草的

工艺条件可为 100 kg 生甘草加入炼蜜 25 kg, 闷润 15 min, 炒制温度 160 °C, 炒制 13 min, 则可达到炮制要求。

**2.4.4 验证实验** 对该方案进行 3 次验证性实验, 加蜜量 1 : 4, 炒制时间 13 min, 炒制锅底温度为 160 °C, 见表 8。蜜炙甘草工艺验证结果平均综合得分为 95.33, 与模型预测值 (96.42) 相近, 且 RSD 为 0.99%, 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。

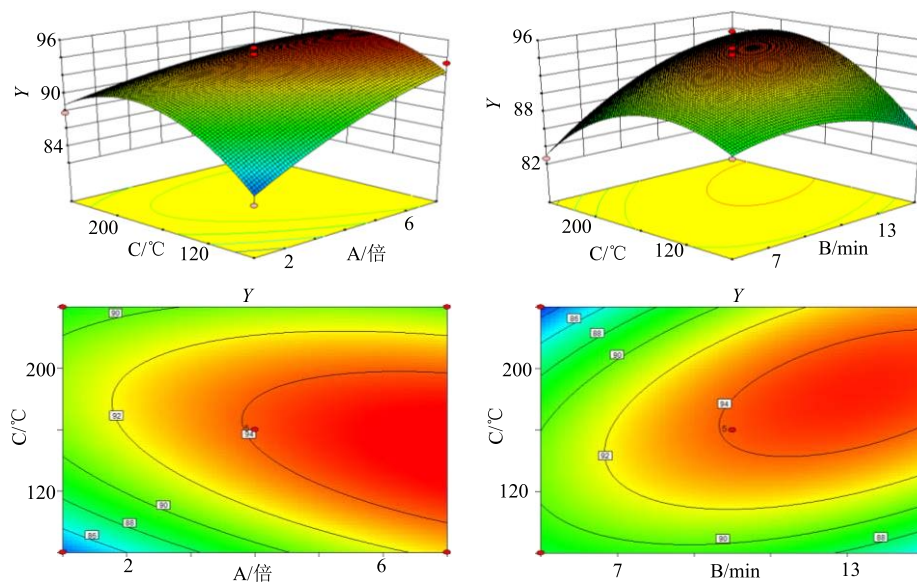


图 2 炒制时间与炒制温度以及加蜜倍数与炒制温度交互作用的等高线图和响应曲面图

Fig. 2 Contour diagram and response surface diagram of interaction between frying time and frying temperature, honey addition multiple and frying temperature

表 8 验证实验结果

Table 8 Verification of test results

序号	加蜜倍数	炒制时间/min	炒制温度/°C	综合评分	平均综合评分	RSD/%
1	1/4	13	160	95.47	95.33	0.99
2	1/4	13	160	94.32		
3	1/4	13	160	96.19		

### 3 讨论与结论

#### 3.1 检测方法 & 检测指标的选择

本实验采用 HPLC 法, 以甘草苷、甘草素、甘草查耳酮 A、甘草次酸 4 种成分作为评价指标优选蜜炙甘草的炮制工艺。实验选定的 4 种成分中甘草苷、甘草素、甘草查耳酮 A 属黄酮类成分, 甘草次酸属皂苷类成分, 为甘草药材中最主要的 2 类药效成分, 实验考察指标兼顾 2 类成分, 能使实验优选的炮制工艺更能保证甘草应有的药效作用。

与《中国药典》2015 年版比较, 测定指标的选择除增加了甘草素与甘草查耳酮 A 外, 尚将甘草酸(所用对照品为甘草酸铵)替换为甘草次酸<sup>[1]</sup>。实验曾将甘草酸也列为考察指标, 在进行测定条件优化时发现从兼顾多种成分的角度看, 无论是从峰形还是色谱峰的分离难易程度, 甘草次酸优于甘草酸; 另据文献报道<sup>[6]</sup>, 就蜜炙甘草而言, 甘草苷的含量会增加, 而甘草酸的含量会显著降低, 降低幅度达 20%, 但甘草酸的苷元甘草次酸的含量则明显增加; 此外甘草酸铵对照品价格远高于甘草次酸; 再加上甘草次酸同样具有甘草酸的促肾上腺皮质激素样生物活性<sup>[7]</sup>, 为保证实验方法的精确性, 兼顾 2 类 4 种成分, 更为降低实验成本尤其是方法可能的在甘草药材及含甘草类中药制剂质量控制中实际应用的经济性, 故实验最终将甘草苷、甘草素、甘草查耳酮 A、甘草次酸作为考察指标。实验设计也为中药及其成品制剂进行质量控制研究时考察指标的选择提供一定借鉴。

相较于《中国药典》2015 年版除考察指标、流动相梯度外, 检测波长有明显差异, 《中国药典》2015 年版测定波长为 237 nm<sup>[1]</sup>, 实验确定的测定波长是 260 nm。实验曾考察了 4 种成分同时在不同波长下的保留峰响应情况, 包括供试品溶液与对照品溶液, 结果显示在 260 nm 波长各成分峰形好、吸收强度高, 且基本达到基线分离, 故选用此波长。

#### 3.2 评价方法的选择

实验利用一测多评法评价不同炮制条件下炙甘草中的甘草苷及其他 3 种活性成分的含量变化情况。一测多评是采用 1 个对照品来实现对多个成分的同时测定, 对于一些制备困难或价格昂贵的对照品具有实际应用价值, 利于降低检测成本<sup>[8]</sup>, 如孟江等<sup>[9]</sup>采用一测多评法同时测定干姜中 4 种姜酚类成分的含量。甘草含有黄酮类、三萜类、多糖等活性成分<sup>[10]</sup>, 目前已有同时测定其所含 2~5 种化学

成分含量的报道<sup>[11-13]</sup>, 但尚未有进行一测多评的报道。本实验采用一测多评法, 以甘草苷对照品为内标物, 考察蜜炙甘草的炮制工艺, 既保证了评价体系的相对全面与客观, 又为甘草药材采用一测多评进行质量评价提供参考。

#### 3.3 炮制工艺研究以及各影响因素相互影响

根据蜜炙工艺, 实验设定加蜜量、炒制温度、浸泡润润时间、炒制时间为考察因素, 实验先通过单因素考察, 了解每个因素对炮制品中各成分的影响情况, 再参照单因素实验结果采用响应曲面法优选各因素的最佳条件。响应曲面法是一种有效的优化工艺参数的方法, 得到的二次多项回归方程不仅精度高还能分析因素之间的交互作用, 与其他实验设计方法相比, 呈现出更多的优势<sup>[14]</sup>。依据单因素实验结果, 实验选择加蜜倍数、炒制时间、炒制温度等对综合评分影响明显的因素, 采用响应曲面法优化蜜炙甘草炮制工艺, 最佳条件为加蜜量 1/4, 炒制时间 13 min, 炒制温度 160 °C。实验结果显示整体模型  $P < 0.01$ , 而失拟检验值  $P > 0.05$ , 表明软件拟合的二次回归方程模型具有显著性, 模型选择较为合适, 整体说明采用响应曲面模型预测蜜炙甘草的综合评分具有可行性, 也即该方法优选的蜜炙甘草的炮制工艺是可信的。

此外实验结果显示加蜜倍数与炒制时间是显著影响因素 ( $P < 0.05$ ), 该结果与单因素实验结果相一致, 这也从另一个侧面表明实验结果的可信性。实验结果尚显示加蜜量与炒制温度及炒制时间与炒制温度之间交互作用均比较明显, 说明虽说炒制温度在本实验中属于不显著因素, 但也必须重视其对实验结果的影响, 以保证蜜炙甘草的质量。验证试验表明该炮制条件下, 炮制品质量稳定性, 具有实际应用价值。

#### 3.4 关于加蜜量

单因素实验显示, 加蜜量达药材量的 1/4 时, 各成分含量基本达到稳定状态, 响应曲面实验优选的加蜜量也为药材量的 1/3.7, 也即接近 1/4, 实验结果与文献记载的蜜炙甘草加蜜量相吻合, 更与《中国药典》2015 年版规定的蜜炙甘草加蜜量相吻合, 实验结果在一定程度上佐证了中药传统蜜炙工艺的合理性。

#### 参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 王 奇. 《伤寒论》方中炙甘草炮制方法探析 [J]. 河

- 北中医, 2013, 35(11): 1654-1655.
- [3] 孙立立, 张 泰, 周 倩, 等. 甘草历代炮制方法概述 [J]. 中成药, 2010, 32(7): 1188-1190.
- [4] 陈 靖, 冯 锋, 刘建鑫, 等. 均匀设计法优化蜜炙甘草工艺研究 [J]. 宁夏医科大学学报, 2012, 3(2): 193-195.
- [5] 周 倩, 张 泰, 石典花, 等. 正交试验法优选甘草最佳蜜炙工艺 [J]. 中成药, 2010, 32(3): 447-450.
- [6] 张玉龙, 王梦月, 杨静玉, 等. 炙甘草化学成分及药理作用研究进展 [J]. 上海中医药大学学报, 2015, 29(3): 99-102.
- [7] 匡海学. 中药化学 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2017.
- [8] 王智民, 高慧敏, 付雪涛, 等. “一测多评”法中药质量评价模式方法学研究 [J]. 中国中药杂志, 2006, 31(23): 1925-1928.
- [9] 孟 江, 卢国勇, 程轩轩, 等. 一测多评法同时测定干姜中 4 种姜酚类成分的含量 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(7): 77-80.
- [10] 田庆来, 官月平, 张 波, 等. 甘草有效成分的药理作用研究进展 [J]. 天然产物研究与开发, 2006, 29(3): 343-347.
- [11] 张崇禧, 杨春花, 蔡恩博, 等. HPLC 分析甘草中甘草酸和甘草苷含量 [J]. 资源开发与市场, 2010, 26(8): 673-675.
- [12] 陈云华, 赵晓霞, 王文全, 等. 高效液相色谱法同时测定甘草中甘草酸、甘草苷、异甘草素的含量 [J]. 中国中医药信息杂志, 2009, 16(8): 52-54.
- [13] 尚晓娜, 宋平顺, 杨 锡, 等. 毛细管区带电泳-多波长法测定甘草中 6 种有效成分的含量 [J]. 中国医院药学杂志, 2012, 32(23): 1866-1869.
- [14] 陈 亮, 张 炜, 陈元涛, 等. 响应曲面法优化黑果枸杞多糖的超声提取工艺 [J]. 食品科技, 2015, 40(1): 220-226.