

Box-Behnken 响应面法优化彝药蜜酒同制大黄工艺

王 玥¹, 吕露阳¹, 李 莹¹, 何建萍², 肖汝明³, 杨 凯¹, 马子豪¹, 曾 锐^{1*}

1. 西南民族大学药学院, 四川 成都 610041

2. 楚雄州中医院, 云南 楚雄 675000

3. 黑水县科学技术和知识产权局, 四川 黑水 623500

摘要: 目的 采用 Box-Behnken 响应面法对蜜酒同制大黄的炮制工艺进行优化。方法 以有效成分及浸出物含量结合感官评分为指标, 对粉碎粒度、蒸制时长、闷润温度、含水量 4 个因素进行单因素考察。在单因素试验基础上, 利用 HPLC 法测定蜜酒同制大黄中游离蒽醌、总蒽醌的含量和热浸法测定浸出物的含量, 并以上述 3 种指标含量的总评归一值为考察指标, 对蒸制时间、闷润温度、含水量 3 个因素进行响应面考察, 从而优选蜜酒同制大黄的最佳炮制工艺。结果 最佳炮制工艺条件为粉碎粒度过 100 目筛细粉, 蒸制时长 3.5 h, 闷润温度 33 °C, 含水量 43%。结论 优化的炮制工艺简单可行, 为规范蜜酒同制大黄的生产工艺提供了科学依据。

关键词: 大黄; 蜜酒同制; 炮制工艺; Box-Behnken 设计; 响应面法; 高效液相色谱法

中图分类号: R283.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)04-0844-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.04.009

Optimization of Yi medicine processing technology for honeyed wine rhubarb by Box-behnken design response surface methodology

WANG Yue¹, LV Lu-yang¹, LI Ying¹, HE Jian-ping², XIAO Ru-ming³, YANG Kai¹, MA Zi-hao¹, ZENG Rui¹

1. School of Pharmacy, Southwest Minzu University, Chengdu 610041, China

2. Chinese Medicine Hospital of Chuxiong Prefecture, Chuxiong 675000, China

3. Science, Technology, and Intellectual Property Office of Heishui County, Heishui 623500, China

Abstract: Objective To optimize the processing technology of honeyed wine rhubarb by Box-behnken design response surface methodology. **Methods** Taking the content measurement combined with the sensory score as the index, the factors of particle size, steaming time, storage temperature, and moisture content were investigated by single factor tests. On the basis of the results of single factor experiments, the free and total anthraquinones contents and the extract content in honeyed wine rhubarb were determined by HPLC method and hot-dip method, respectively. Three factors (steaming time, storage temperature, and the moisture content) were investigated further by response surface, the processing technology of honeyed wine rhubarb was optimized by response surface methodology. **Results** The optimal parameters of processing technology were as follows: particle size was the powder through 100 mesh sieves, steaming time was 3.5 h, storage temperature was 33 °C, and moisture content was 43%. **Conclusion** The optimized processing technology is simple and feasible, which can provide a reference for the processing of honeyed wine rhubarb.

Key words: *Rhei Radix* et *Rhizoma*; honeyed wine rhubarb; processing technology; Box-Behnken design; response surface methodology; HPLC

大黄, 彝药名冻巴、勒乌, 是我国传统中、彝 来自于蓼科植物掌叶大黄 *Rheum palmatum* L.、唐古
医用药材, 汉医和彝医文献均有记载, 其药用植物 特大黄 *Rheum tanguticum* Maxim. ex Baff. 或药用大

收稿日期: 2018-11-01

基金项目: 国家重点研发计划 (2017YFC1700705); 四川省留学人员科技活动项目择优资助经费计划 (2018-68); 四川省基础研究重点项目 (2018JY0069); 西南民族大学 2018 中央高校重点项目 (2018NZD18); 四川省扶贫专项 (2016NZYZF0015); 西南民族大学研究生创新型科研项目 (CX2017SZ094); 大学生创新项目 (X201810656213)

作者简介: 王 玥 (1994—), 女, 硕士研究生。Tel: 18328594237 E-mail: Yuewang1012@126.com

*通信作者 曾 锐, 副教授, 主要从事中药及民族药炮制制剂研究。Tel: (028)85522099 E-mail: rzeng@swun.edu.cn

黄 *Rheum officinale* Baill. 的干燥根及根茎^[1]。大黄中主要活性成分为蒽醌类化合物及其衍生物如芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚及大黄素甲醚^[2-3]等，其药理作用主要有泻下、止血、抗病原微生物、抗炎、抗肿瘤、保护心脑血管、保肝及抗衰老^[4-12]。大黄性味苦寒，归脾、胃、大肠、肝、心包经^[1]，常用于治疗便秘、黄疸、消化道出血和溃疡等症^[4,13-14]。大黄在彝医中还用于治疗胎盘不下、疟疾、冻伤及泡水服消暑防病等，是彝医的独特用法^[13,15]。蜜酒同制大黄是彝药特色炮制品，经蜜酒制及发酵后，

可清上焦血分热毒，减缓大黄的峻下作用，可治疗目赤咽痛、清胃肠湿热和消暑等^[16]。

彝药蜜酒同制大黄文献收载有多种炮制方法，较为常用及简便的一种为将蜂蜜炼老，大黄研粉，兑入黄酒与药粉，捣成泥状，共蒸 2 h 左右至透，搓成直径 4 cm 的长条，晒至 7 成干，闷 10 d 至内外湿润一致时，切成片晾干。每 100 kg 冻巴(大黄)，用炼老蜂蜜 40 kg，黄酒 45 kg^[16-17]。该工艺与 2005 年版《河南省中药饮片炮制规范》中记载的清宁片炮制工艺^[18]较为相似，但仍有区别。工艺对比见表 1。

表 1 清宁片与蜜酒同制大黄的炮制工艺对比

Table 1 Comparison on processing technology between Qingning Tablets and honeyed wine rhubarb

考察指标	清宁片	彝药蜜酒同制大黄
大黄-黄酒-蜂蜜比	100 : 75 : 40	100 : 45 : 40
原料加工	熬煮 2 h 至烂，加入黄酒 (100 : 30)，煮烂成泥，晒干后粉碎	生大黄直接打粉
粉碎粒度	过 100 目筛	—
混合形态	揉成团块	捣成泥状
蒸制时长	2 h	2 h、2~3 h 或 3 h
搓条直径	14 mm	4 cm
干燥温度	50~55 °C 低温干燥	—
含水量	7 成干	7 成干
闷润时间	10 d	10 d
饮片形态	切厚片	切片
贮存前处理	干燥	晾干

作为一种传统彝药炮制特色的工艺和品种，蜜酒同制大黄在中、彝药文献中的工艺研究甚少，其炮制规范及质量标准方面的研究亦未见报道。文献中存在部分关键工艺参数尚不明确，如粉碎粒度、干燥温度、闷润温度等，含水量等为经验指标，蒸制时长在不同文献中有一定差异^[16-17]，不利于蜜酒同制大黄的规范化生产和质量控制。根据民族药中药的质量评价应以多个质量标志物 (Q-marker) 相关成分为指标^[19]，本研究拟使用单因素考察结合 Box-Behnken 响应面 (BBD-RSM) 设计，以蜜酒同制大黄中游离蒽醌含量、总蒽醌含量、浸出物含量的总评归一值 (OD)^[20]为评价指标，优化蜜酒同制大黄的最佳炮制工艺。

1 仪器与材料

Waters 2695/2996 型高效液相色谱仪，包括真空脱气机、四元泵、自动进样器、柱温箱，UV2489 检测器，Empower 2.0 工作站，美国 Waters 公司；Diamonsil C₁₈ (150 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱，

大连依利特分析仪器有限公司；ESJ200-4 型万分之一电子天平，沈阳龙腾电子有限公司；BT25S 型十万分之一电子天平，北京赛多利斯科学仪器有限公司；SENCO-R 系列 W201 恒温水浴锅，上海申生科技有限公司；KQ5200E 型超声波清洗器，昆山超声仪器有限公司；DHG-9240A 型电热恒温鼓风干燥箱，上海一恒科学仪器有限公司。

对照品芦荟大黄素 (批号 120425)、大黄酸 (批号 131220)、大黄素 (批号 120210)、大黄酚 (批号 130522) 和大黄素甲醚 (批号 131014)，质量分数均 ≥ 98%，均为成都普菲德有限公司产品。流动相甲醇为色谱纯，Fisher 公司，批号 171223；磷酸为分析纯，质量分数 ≥ 85.0%；提取用甲醇为分析纯，质量分数 ≥ 99.5%，购于成都市科龙化工试剂厂；水为自制超纯水，Thremo Barnstead Gen Pure UV/UF 小型超纯水系统制备。大黄药材采自四川省阿坝州黑水县，经中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所黄林芳教授鉴定为掌叶大黄 *Rheum*

palmatum L., 蜂蜜为四川省阿坝州黑水县阿坝中蜂蜜, 黄酒为市售品。

2 方法与结果

2.1 蜜酒同制大黄的制备

取大黄适量, 粉碎, 过 100 目筛, 取细粉 100 g, 兑入炼老蜂蜜 40 g, 黄酒 45 g, 混合均匀, 捣成泥状, 蒸 2 h 至透, 搓成直径 4 cm 的长条, 50 °C 烘至含水量 40%, 置密封容器内, 于 30 °C 闷润 10 d, 至内外湿润一致时, 取出, 切成 3~5 mm 厚片, 晾干^[17]。

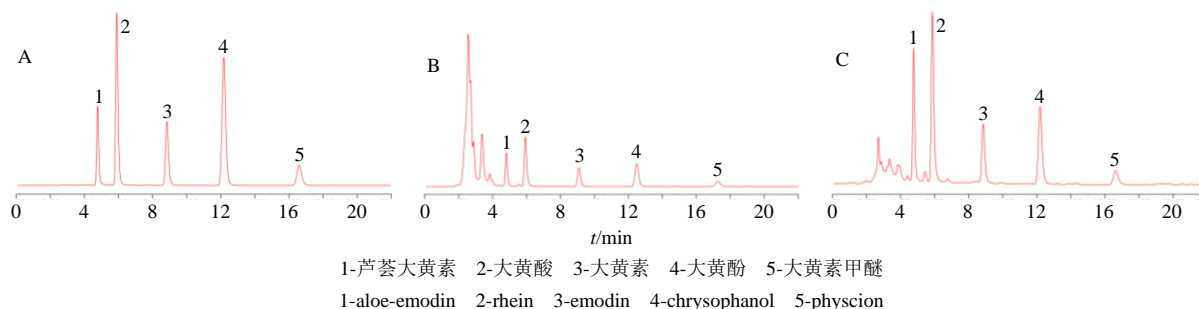


图 1 混合对照品 (A)、游离蒽醌供试品 (B)、总蒽醌供试品 (C) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC of mixed reference substance (A), free anthraquinone test solution (B), and total anthraquinone test solution (C)

对照品 0.28 mg、大黄酸对照品 1.17 mg、大黄素对照品 0.25 mg、大黄酚对照品 0.55 mg、大黄素甲醚对照品 0.18 mg, 加甲醇定容至 10 mL 量瓶中, 制成含芦荟大黄素 0.028 mg/mL、大黄酸 0.117 mg/mL、大黄素 0.025 mg/mL、大黄酚 0.055 mg/mL、大黄素甲醚 0.018 mg/mL 的混合对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备

(1) 游离蒽醌供试品溶液的制备: 精密称定本品 0.5 g, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 25 mL, 称定质量, 加热回流 1 h, 放冷, 再称定质量, 用甲醇补足减失质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 作为游离蒽醌供试品溶液。

(2) 总蒽醌供试品溶液的制备: 精密称定本品 0.15 g, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 25 mL, 称定质量, 加热回流 1 h, 放冷, 再称定质量, 用甲醇补足减失质量, 摇匀, 滤过。精密量取续滤液 5 mL, 置烧瓶中, 挥去溶剂, 加 8% 盐酸溶液 10 mL, 超声处理 2 min, 再加三氯甲烷 10 mL, 加热回流 1 h, 放冷, 置分液漏斗中, 用少量三氯甲烷洗涤容器, 并入分液漏斗中, 分取三氯甲烷层, 酸液再用三氯甲烷提取 3 次, 每次 10 mL, 合并三氯甲烷液, 减压回收溶剂至干, 残渣加甲醇使溶解, 转移至 10 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度。摇匀, 滤过, 取续滤液,

2.2 游离蒽醌和总蒽醌的定量测定^[21-22]

2.2.1 色谱条件 Hypersil C₁₈ 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相甲醇-0.1% 磷酸水溶液 (85 : 15), 柱温 30 °C, 进样量 10 μL, 检测波长 254 nm, 体积流量 1.0 mL/min。按上述色谱条件检测蜜酒同制大黄中芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚的量, 游离蒽醌的量、总蒽醌的量分别以上述 5 种成分的总量计。混合对照品、游离蒽醌供试品、总蒽醌供试品色谱图见图 1。

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取芦荟大黄素对

作为总蒽醌供试品溶液。

2.2.4 线性关系考察 精密吸取“2.2.2”项下对照品溶液, 按上述色谱条件依次进样 2、6、10、14、18、22 μL, 以进样量为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y), 得到线性回归方程及相关系数 (r)。芦荟大黄素 $Y=93\ 314 X-83\ 359$, $r=0.999\ 8$, 进样量线性范围 0.056~0.616 μg; 大黄酸 $Y=239\ 384 X-200\ 325$, $r=0.999\ 9$, 进样量线性范围 0.234~2.574 μg; 大黄素 $Y=109\ 566 X-87\ 979$, $r=0.999\ 9$, 进样量线性范围 0.050~0.550 μg; 大黄酚 $Y=267\ 322 X-202\ 982$, $r=0.999\ 9$, 进样量线性范围 0.110~1.210 μg; 大黄素甲醚 $Y=56\ 763 X-52\ 006$, $r=0.999\ 9$, 进样量线性范围 0.036~0.396 μg。

2.2.5 精密度试验 精密吸取同一对照品溶液 10 μL, 连续进样 6 次, 计算芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚峰面积的 RSD 分别为 0.98%、0.86%、0.37%、0.56%、0.39%, 表明仪器精密度良好。

2.2.6 稳定性试验 按“2.2.3”项下方法分别制备游离蒽醌供试品溶液和总蒽醌供试品溶液 (响应面实验中 8 号样品), 分别于 0、4、6、8、12、24 h 进行 HPLC 测定, 计算得游离蒽醌供试品中芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚峰面

积的 RSD 分别为 0.19%、0.32%、0.98%、0.25%、0.41%，总蒽醌供试品中芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚峰面积的 RSD 分别为 0.37%、0.21%、0.27%、0.64%、0.82%，结果表明，游离蒽醌供试品溶液和总蒽醌供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.2.7 重复性试验 取同一炮制方法下的样品（响应面实验中 8 号样品），依“2.2.3”项下游离蒽醌供试品溶液和总蒽醌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 μL ，按前述色谱条件进样，测定峰面积。计算得游离蒽醌供试品中芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚质量分数的 RSD 分别为 1.53%、0.87%、1.17%、0.91%、1.01%，游离蒽醌供试品中芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚峰质量分数的 RSD 分别为 0.99%、1.01%、1.18%、1.24%、0.87%，表明本方法重复性良好。

2.2.8 加样回收率试验 精密量取已知游离蒽醌含量的蜜酒同制大黄供试品溶液（响应面实验中 8 号样品）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（芦荟大黄素 0.065 mg/mL、大黄酸 0.019 mg/mL、大黄素 0.037 mg/mL、大黄酚 0.058 mg/mL、大黄素甲醚 0.024 mg/mL），每个质量浓度平行 3 份，按“2.2.1”项下色谱条件测定各指标成分的含量。总蒽醌供试品溶液的加样回收率试验同法操作。计算得到游离蒽醌供试品溶液中芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚的平均回收率分别为 102.69%、104.13%、94.65%、95.13%、102.82%，RSD 分别为 1.86%、1.89%、1.39%、1.16%、1.36%；总蒽醌供试品溶液中芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚的平均回收率分别为 97.82%、102.39%、99.45%、103.90%、101.76%，RSD 分别为 1.73%、1.90%、1.88%、1.35%、1.48%，表明加样回收率良好。

2.3 浸出物的测定

精密称定本品 2 g，精密称定，置 250 mL 锥形瓶中，精密加水 100 mL，密塞，称定质量，静置 1 h，连接回流冷凝管，加热至沸腾，并保持微沸 1 h。放冷后，取下锥形瓶，密塞，再称定质量，用水补足减失质量，摇匀，用干燥滤器滤过，精密量取滤液 25 mL，置已干燥至恒定质量的蒸发皿中，在水浴上蒸干后，于 105 $^{\circ}\text{C}$ 干燥 3 h，置干燥器中冷却

30 min，迅速精密称定质量。以干燥品计算供试品中水溶性浸出物的含量。

2.4 水分的测定

按照《中国药典》2015 年版水分测定法（通则 0832）项下烘干法测定蜜酒同制大黄样品中的水分。精密称定蜜酒同制大黄样品 2 g，平铺于干燥至恒定质量的扁形称量瓶中（厚度不超过 5 mm），开启瓶盖在 100~105 $^{\circ}\text{C}$ 干燥 5 h，将瓶盖盖好，移置干燥器中，放冷 30 min，精密称定，再在上述温度干燥 1 h，放冷，称定质量，至连续 2 次称定质量的差异不超过 5 mg 为止。根据减失的质量，计算供试品中的水分。

2.5 单因素试验

2.5.1 不同粉碎粒度 准确称取大黄药材 100 g，打粉，分别过三号筛（50 目）、五号筛（80 目）、六号筛（100 目）、七号筛（120 目）、八号筛（150 目），按比例与黄酒、炼蜜混合，固定其余条件，考察不同粉碎粒度对蜜酒同制大黄中游离蒽醌含量、总蒽醌含量、浸出物含量的总评归一值（OD）的影响，并结合炮制品的感官评价进行评分。OD 值的计算采用 Hassan 方法对各指标成分的含量进行标准化转换，使其表示为 0~1 的归一值（ d ）， $d_i = (Y_i - Y_{\min}) / (Y_{\max} - Y_{\min})$ 。其中， Y_i 为实测值， Y_{\min} 和 Y_{\max} 分别指每一指标在不同次试验中测得的所有值中的最小值和最大值。根据公式 $\text{OD} = (d_1 d_2 d_3 \cdots d_k)^{1/k}$ （ k 为指标数）求得 OD 值^[20]。感官评分方法采用 9 人评分法（4 男 5 女，20~25 岁），从 3 个方面进行评分（表 2）。由表 3 可知，药材粉碎越细，OD 值越高，过 100 目筛后的细粉 OD 值差异不大，在 120 目处达到最大值。同时，随着粉碎粒度的增大，其炮制品的感官评分也随之增加，在 100 目处达最大值，此后呈下降趋势。因此，结合 OD 值和炮制品感官评分，确定粉碎粒度为过 100 目筛细粉。

2.5.2 不同蒸制时间 准确称取大黄药材 100 g，固定其余条件，考察不同蒸制时间 1、2、3、4 h 对蜜酒同制大黄中游离蒽醌含量、总蒽醌含量、浸出物含量的 OD 值的影响，并结合炮制品的感官评价进行评分。由表 4 可知，随着蒸制时间的增加，OD 值亦呈增大趋势，在 3 h 处达到最大值，此后数值有所下降。表 4 同时显示，随着蒸制时间的增加，炮制品的感官评分同样趋于升高，因此，蒸制时间的水平选取 2、3、4 h 进行后续 Box-Behnken 试验考察。

表 2 感官评分标准
Table 2 Sensory evaluation criteria

因子	档次	品质特征	感官评分	评分系数/%
香气 (a)	甲	具有强烈的发酵特有香味, 香气浓郁, 无异味	90~99	25.0
	乙	具有发酵的香味, 香气不够柔和	80~89	
	丙	具有类似发酵的香味, 但稍有异味	70~79	
色泽 (b)	甲	色泽均匀, 乌黑如漆, 发亮	90~99	37.5
	乙	色泽较均匀, 色乌黑	80~89	
	丙	色泽不均匀, 偏黄棕色, 可见黄色颗粒	70~79	
状态 (c)	甲	手摸有挺劲, 柔韧度佳, 易切片, 不易碎断	90~99	37.5
	乙	手摸较硬挺, 切片时较不易碎断	80~89	
	丙	手摸过硬或过软, 切制不能成片, 易碎断	70~79	

感官评分 = a × 25.0% + b × 37.5% + c × 37.5%

sensory evaluation score = a × 25.0% + b × 37.5% + c × 37.5%

表 3 粉碎粒度对 OD 值及感官评分的影响

Table 3 Effects of particle size on OD value and sensory evaluation score

粉碎粒度/目	OD 值	感官评分
50	0.29	85
80	0.66	88
100	0.87	93
120	0.88	92
150	0.85	89

表 4 蒸制时间对 OD 值及感官评分的影响

Table 4 Effects of steaming time on OD value and sensory evaluation score

蒸制时间/h	OD 值	感官评分
1	0.17	78
2	0.57	85
3	0.86	90
4	0.84	92

2.5.3 不同闷润温度 准确取大黄药材 100 g, 固定其余条件, 考察不同闷润温度 24、27、30、33 °C 对蜜酒同制大黄游离蒽醌含量、总蒽醌含量、浸出物含量的 OD 值的影响, 并结合炮制品的感官评价进行评分。由表 5 显示, OD 值随着温度的升高而逐渐增大, 但在 30 °C 以后, OD 值开始下降, 而感官评分的变化趋势也与 OD 值相同。此外, 温度过高可能产生霉变现象, 因此在后续 Box-Behnken 试验优化设计中, 选取 27、30、33 °C 作为闷润温度的水平范围。

2.5.4 不同含水量 准确称取大黄药材 100 g, 固定其余条件, 考察不同含水量 30%、40%、50%、

表 5 闷润温度对 OD 值及感官评分的影响

Table 5 Effects of storage temperature on OD value and sensory evaluation score

闷润温度/°C	OD 值	感官评分
24	0.42	91
27	0.61	95
30	0.85	96
33	0.80	90

60% 对蜜酒同制大黄中游离蒽醌含量、总蒽醌含量、浸出物含量的 OD 值的影响。并结合炮制品的感官评价进行评分。根据表 6 数据, OD 值随着含水量的增大而升高, 在含水量达到 40% 之后, OD 值逐渐下降。随着含水量的增加, 其炮制品的感官评分也增加, 在含水量 50% 时, 炮制品外观乌黑如漆有光泽, 弹性最佳, 感官评分最高。因此在进一步 Box-Behnken 试验优化设计中, 含水量的水平选取范围为 30%~50%。

2.6 Box-Behnken 响应面法优化试验设计

2.6.1 试验设计与结果 在单因素实验的基础上, 选取蒸制时间 (A)、闷润温度 (B)、含水量 (C) 为考察因素, 以游离蒽醌 (Y₁)、总蒽醌 (Y₂)、浸

表 6 含水量对 OD 值及感官评分的影响

Table 6 Effects of moisture content on OD value and sensory evaluation score

含水量/%	OD 值	感官评分
30	0.78	87
40	0.89	95
50	0.76	98
60	0.61	91

出物 (Y₃) 的 OD 值为评价指标进行 Box-Behnken 试验设计。各因素水平见表 7。Box-Behnken 试验设计方案和 OD 值数据见表 7。

2.6.2 模型拟合及显著性分析 使用 Design Expert 10.0 软件, 将表 7 中各组指标成分的 OD 值数据进行多元回归拟合和二项式分析, 建立蜜酒同制大黄

炮制工艺 OD 值对蒸制时间 (A)、闷润温度 (B)、含水量 (C) 的二次回归模型方程: $OD=0.92+0.094A+0.061B+0.257C+0.094AB+0.040AC-0.031BC-0.15A^2-0.056B^2-0.48C^2$ 。回归模型的方差分析结果见表 8。

由表 8 可知, 拟合模型的 P 值小于 0.01, 说明

表 7 实验设计及结果

Table 7 Design and results of response surface

序号	A/h	B/°C	C/%	Y ₁ /%	Y ₂ /%	Y ₃ /%	OD 值	序号	A/h	B/°C	C/%	Y ₁ /%	Y ₂ /%	Y ₃ /%	OD 值
1	4 (1)	30 (0)	50 (1)	0.60	1.71	29.14	0.66	10	2 (-1)	30 (0)	30 (-1)	0.53	1.51	26.04	0
2	3 (0)	30 (0)	40 (0)	0.62	1.78	30.37	0.88	11	3 (0)	33 (1)	50 (1)	0.60	1.72	29.43	0.71
3	3 (0)	30 (0)	40 (0)	0.62	1.82	30.71	0.93	12	2 (-1)	33 (1)	40 (0)	0.58	1.66	28.36	0.51
4	4 (1)	27 (-1)	40 (0)	0.60	1.72	29.45	0.71	13	3 (0)	27 (-1)	30 (-1)	0.52	1.53	25.46	0
5	3 (0)	30 (0)	40 (0)	0.64	1.77	30.21	0.90	14	3 (0)	27 (-1)	50 (1)	0.59	1.68	28.66	0.57
6	4 (1)	33 (1)	40 (0)	0.63	1.80	30.70	0.94	15	2 (-1)	30 (0)	50 (1)	0.57	1.64	27.97	0.44
7	3 (0)	33 (1)	30 (-1)	0.55	1.58	27.01	0.26	16	4 (1)	30 (0)	30 (-1)	0.53	1.52	25.84	0.05
8	3 (0)	30 (0)	40 (0)	0.63	1.80	31.01	0.96	17	2 (-1)	27 (-1)	40 (0)	0.60	1.71	29.15	0.66
9	3 (0)	30 (0)	40 (0)	0.63	1.79	30.52	0.91								

表 8 回归模型方差分析

Table 8 Analysis and variance

方差来源	平方和	自由度	F 值	P 值	方差来源	平方和	自由度	F 值	P 值
模型	1.80	9	60.73	<0.000 1	B ²	0.013	1	4.07	0.083 3
A	0.071	1	21.66	0.002 3	C ²	0.95	1	289.46	<0.000 1
B	0.030	1	9.12	0.019 4	残差	0.023	7		
C	0.53	1	160.40	<0.000 1	失拟项	0.019	3	6.29	0.053 9
AB	0.035	1	10.74	0.013 5	纯误差	4.022×10 ⁻³	4		
AC	6.509×10 ⁻³	1	1.98	0.202 0	总变异	1.82	16		
BC	3.772×10 ⁻³	1	1.15	0.319 4	r ²	0.987 4			
A ²	0.10	1	30.53	0.000 9	r ² _{adj}	0.971 1			

P<0.05 表示差异显著; P<0.01 表示差异极显著

P < 0.05 significant difference; P < 0.01 more significant difference

该模型极显著。失拟项的 P 值为大于 0.05, 表明该模型拟合良好, 模型的残差可能是随机误差产生的。在 1 次项中, A、B、C 均为显著项 (P<0.05), 显著程度 C>A>B, 说明含水量对响应值的影响最大, 蒸制时长其次, 闷润温度最末; 2 次项中, A² 和 C² 为显著项, B² 为不显著项, 说明闷润温度、含水量对响应值的影响是非线性的; 交互项中, AB 为显著项, AC、BC 均为不显著项, 表明蒸制时长与闷润温度之间交互影响非常明显。模型的总决定系数 r²=0.987 4, 调整系数 r²_{adj}=0.971 1, 表明该模型拟合程度高, 试验误差小, 可解释 98.74% 的试

验数据变异性, 能够良好地反映蜜酒同制大黄中游离蒽醌 (Y₁)、总蒽醌 (Y₂) 和浸出物 (Y₃) 总含量的 OD 值和炮制过程中 3 个因素蒸制时间 (A)、含水量 (B)、闷润温度 (C) 之间的变化关系, 可以通过此模型对蜜酒同制大黄的炮制工艺进行分析和预测。

2.6.3 最优炮制工艺预测及试验验证比较 利用 Design Expert 10.0 软件拟合的蒸制时长 (A)、闷润温度 (B)、含水量 (C) 3 个因素的交互作用对 OD 值的影响见图 2。

根据软件分析结果, 计算及预测二次回归方程,

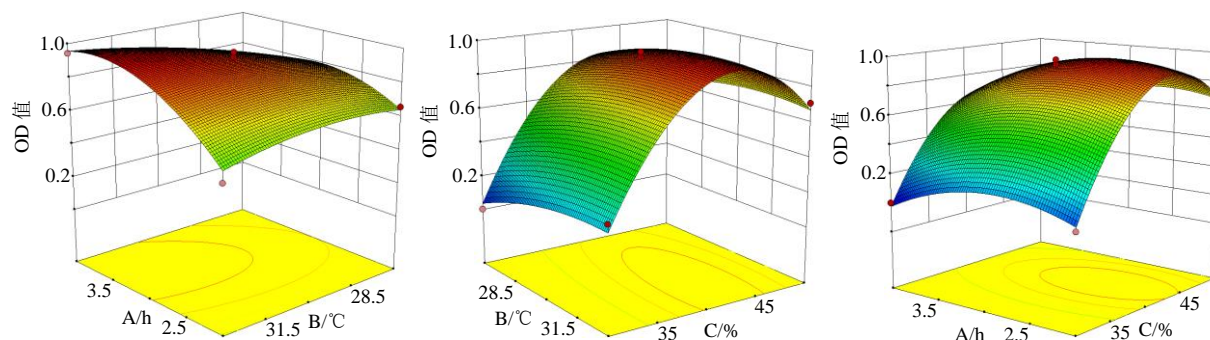


图 2 蒸制时长 (A)、闷润温度 (B) 和含水量 (C) 的交互作用响应面图

Fig. 2 Response surface diagram of steaming time (A), storage temperature (B), and moisture content (C) for their mutual interaction

得到蜜酒同制大黄的最佳炮制工艺为蒸制时间 3.62 h, 闷润温度 32.61 °C, 含水量 42.78%, 粉碎粒度 100 目。预测游离蒽醌含量为 0.64%, 总蒽醌含量为 1.82%, 浸出物含量为 31.03%。考虑到实际操作的便利, 调整工艺为蒸制时间 3.5 h, 闷润温度 33 °C, 含水量 43%, 粉碎粒度 100 目。以上述条件平行 3 次炮制蜜酒同制大黄, 进行工艺验证试验。结果见表 9。结果显示, 通过优化后的工艺条件炮制的蜜酒同制大黄, 游离蒽醌、总蒽醌与浸出物含量均有所增加, 游离蒽醌平均值为 0.66%, RSD 为 2.30%; 总蒽醌平均值为 1.85%, RSD 为 1.90%; 浸出物含量平均值为 31.16%, RSD 为 0.25%; 与预测值的偏差率分别为 2.53%、1.03% 和 0.29%。实测值数据与预测值基本一致, 说明该实验拟合的数学回归模型是可靠的, 蜜酒同制大黄的炮制工艺成功得到了优化。

表 9 验证试验结果 (n = 3)

Table 9 Results of verification experiments (n = 3)

试验号	游离蒽醌/%	总蒽醌/%	浸出物/%
1	0.68	1.85	31.22
2	0.65	1.81	31.19
3	0.66	1.88	31.07
实测平均值	0.66	1.85	31.16
预测值	0.64	1.82	31.03

3 讨论

《中国药典》2015 年版中, 将芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚作为评价指标, 用以测定大黄及其炮制品的总蒽醌含量及游离蒽醌含量, 同时也测定了水溶性浸出物的含量。本研究设计以上述 3 种成分含量的 OD 值为指标进行含量测定, 同时外观品质是评价炮制品质量不可或缺的

一环, 设计感官评价得分与含量测定相结合, 能更加全面评价蜜酒同制大黄的品质。

经过前期试验考察, 发现炮制过程中蜜酒同制大黄的粉碎粒度、蒸制时间、烘后的含水量、密封期间的闷润温度及闷润时间 5 个因素对炮制品的活性成分含量和外观品质均会产生较大的影响。研究结果表明, 粉碎粒度及闷润时间的改变, 对炮制品的外观品质的影响较大, 而对活性成分的含量影响较小。因此选择活性成分含量较高同时炮制品外观成色更好的工艺条件: 粉碎粒度为过 100 目筛细粉, 闷润时间 10 d。闷润时间与原地方炮制规范记载的闷润时间一致, 为地方炮制规范记载的工艺提供了科学依据^[13,17]。

研究结果还表明蒸制时长、闷润温度、含水量对炮制品的影响主要体现在活性成分的含量差异上, 因此在保证外观品质符合要求的前提下, 进一步筛选最佳工艺条件。原工艺存在蒸制时间不统一, 7 成干需客观量化, 闷润温度未明确等问题, 因此进一步设计 Box-Behnken 响应面试验, 优选出粉碎粒度 100 目筛, 蒸制时间 3.5 h, 闷润温度 33 °C, 含水量 43% 的蜜酒同制大黄最佳炮制工艺。

参考文献

[1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
 [2] Li P, Lu Q, Jiang W, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of rhubarb anthraquinones extract in normal and disease rats [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 91: 425-435.
 [3] Wu W J, Yan R, Li T, et al. Pharmacokinetic alterations of rhubarb anthraquinones in experimental colitis induced by dextran sulfate sodium in the rat [J]. *J Ethnopharmacol*, 2017, 198: 600-607.
 [4] Yang Z, Fan R, Sun P, et al. Rhubarb attenuates cerebral edema via inhibition of the extracellular signal-regulated

- kinase pathway following traumatic brain injury in rats [J]. *Pharmacogn Mag*, 2018, 14(53): 134-139.
- [5] Neyrinck A M, Etxeberria U, Taminiu B, *et al.* Rhubarb extract prevents hepatic inflammation induced by acute alcohol intake, an effect related to the modulation of the gut microbiota [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2017, 61(1): 1-12.
- [6] Zheng Q X, Wu H F, Guo J, *et al.* Review of rhubarbs: Chemistry and pharmacology [J]. *Chin Herb Med*, 2013, 5(1): 9-32.
- [7] 谭 鹏, 张海珠, 李 洋, 等. 基于活血生物效价检测大黄中 10 个蒽醌类成分抗血小板聚集作用初步研究 [J]. *中草药*, 2018, 49(4): 859-865.
- [8] 熊婉媛, 郑 英, 卢利霞, 等. 大黄素对胃肠道黏膜损伤保护作用的机制研究进展 [J]. *现代药物与临床*, 2018, 33(9): 2466-2470.
- [9] 卜天赐, 刘志浩, 刘克辛. 大黄酸对药物转运体和代谢酶影响的研究进展 [J]. *药物评价研究*, 2017, 40(9): 1223-1228.
- [10] 巩 媛, 金秋霞, 白建洋, 等. 大黄对十二烷基硫酸钠损伤的果蝇肠道干细胞活性的影响 [J]. *中草药*, 2017, 48(12): 2466-2473.
- [11] 卢千峰, 李佩瑾, 姜文娇, 等. 大黄酸对大鼠灌胃高剂量对乙酰氨基酚的代谢和排泄的影响 [J]. *现代药物与临床*, 2017, 32(3): 370-375.
- [12] 熊思敏, 张金晓, 康 玮, 等. 大黄素诱导人肝癌 HepG2 细胞线粒体凋亡作用研究 [J]. *药物评价研究*, 2018, 41(5): 773-779.
- [13] 李耕科, 贺延超. 彝医植物药 [M]. 成都: 四川民族出版社, 1990.
- [14] 王海英. 大黄素对 CT26 结肠癌小鼠的作用研究 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2018, 34(12): 1463-1469.
- [15] 云南省彝医院. 云南彝医药·云南彝药 (下卷) [M]. 昆明: 云南科技出版社, 2007.
- [16] 何建萍. 彝药炮制特色 [J]. *中国处方药*, 2017, 15(1): 19-21.
- [17] 田华咏, 瞿显友, 熊朋辉. 中国民族药炮制集成 [M]. 北京: 北京中医古籍出版社, 2000.
- [18] 叶定江, 张世臣, 吴 皓. 中药炮制学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2011.
- [19] 刘昌孝, 陈士林, 肖小河, 等. 中药质量标志物 (Q-Marker): 中药产品质量控制的新概念 [J]. *中草药*, 2016, 47(9): 1443-1457.
- [20] 徐玉玲, 伍利华, 李鹏程, 等. 基于橙皮苷临床利用量的青皮品质评价研究 [J]. *中草药*, 2016, 47(22): 4009-4015.
- [21] Feng S X, Li M M, Zhao D, *et al.* Simultaneous determination of 10 anthraquinones in rhubarb based on HPLC-Q-HR/MS [J]. *Chin Herb Med*, 2017, 9(4): 388-395.
- [22] 谭 鹏, 张海珠, 张 青, 等. UPLC 法同时测定大黄中 10 个蒽醌衍生物的含量 [J]. *中草药*, 2018, 49(4): 928-934.