

· 研究报告 ·

## 星点设计-效应面法优化酒制巴戟天的炮制工艺

张成中<sup>a</sup>, 万赫<sup>a</sup>, 蒋益萍<sup>b</sup>, 贾丹<sup>a</sup>, 冯坤苗<sup>b</sup>, 辛海量<sup>b</sup> (海军军医大学药学院: a. 中药鉴定学教研室; b. 生药学教研室, 上海 200433)

**[摘要]** 目的 以水晶兰苷为指标建立酒制巴戟天最佳炮制工艺。方法 采用星点设计-效应面法以辅料黄酒用量、润药时间为考察因素, 水晶兰苷的含量变化为评价指标, 优化酒蒸巴戟天的炮制工艺。结果 星点设计-效应面法优化酒制巴戟天的最佳炮制工艺为: 辅料黄酒用量为 10%(g/g)、浸润时间为 1 h, 蒸透, 干燥。结论 以黄酒用量、浸润时间为考察因素, 水晶兰苷为评价指标的响应面法能够用于优化酒蒸巴戟天的最佳炮制工艺。

**[关键词]** 效应面法; 巴戟天; 酒制; 炮制工艺

**[中图分类号]** R283 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2020)05-0447-04

**[DOI]** 10.12206/j.issn.1006-0111.202003188

## Process optimization of *Morinda officinalis* with wine steaming by star dot design-response surface methodology

ZHANG Chengzhong<sup>a</sup>, WAN He<sup>a</sup>, JIANG Yiping<sup>b</sup>, JIA Dan<sup>a</sup>, FENG Kunmiao<sup>b</sup>, XIN Hailiang<sup>b</sup> (a. Department of Identification of Traditional Chinese Medicine; b. Department of Pharmacognosy, School of Pharmacy, Naval Medical University, Shanghai 200433, China)

**[Abstract]** **Objective** To establish the best wine steaming process for *morinda officinalis* with monotropein as indicator. **Methods** Response surface methodology was used to optimize the wine steaming process for *morinda officinalis* with the amount of rice wine, stewing time, moistening time and the monotropein content as evaluation indexes. **Results** The best condition was identified with rice wine (rice wine/herbs, g/g) 10%, moistening time 1.0 h, fully steamed and dried. **Conclusion** The Star dot design-response surface method can be used to optimize the wine steaming process for *morinda officinalis*.

**[Key words]** star dot design-response surface methodology; *Morinda officinalis*; wine steaming; processing technology

巴戟天为茜草科植物巴戟天 *Morinda officinalis* How 的干燥根, 始载于《神农本草经》, 位列上品。后世历代文献多有记载, 历版《中国药典》均有收载, 其性温, 味辛、甘, 归肝、肾经; 具有补肾阳, 强筋骨, 祛风湿之功, 临床上常用于肾阳不足引起的阳痿遗精, 宫冷不孕, 月经不调, 少腹冷痛, 风寒湿邪引起的风湿痹痛, 筋骨痿软。巴戟天含有蒽醌类、环烯醚萜苷类、低聚糖类等多种生物活性物质, 具有抗氧化<sup>[1]</sup>、免疫调节<sup>[2]</sup>、镇痛抗炎<sup>[3]</sup>、抗骨质疏松<sup>[4]</sup>、改善生殖能力<sup>[5]</sup>、抗疲劳<sup>[6]</sup>等药理活性。传统炮制理论认为酒能行药势, 活血通络, 祛风散寒, 巴戟天温肾壮阳、强筋健骨、祛风除湿的功效

在酒制后得以增强。查阅古籍中的酒制巴戟天的炮制方法记载数量最多, 酒制巴戟天的方剂在现代中医临床仍广泛应用, 但是由于尚无法定统一的炮制工艺, 现代研究相对较少。本实验在整理、考证巴戟天古今炮制方法文献记载的基础上, 以传统中医药理论为指导, 以水晶兰苷为评价指标, 优选炮制工艺参数, 利用星点设计-效应面法, 建立酒制巴戟天的最佳炮制工艺。

### 1 材料与仪器

#### 1.1 材料

巴戟天(广东德庆采集 2 批、安徽万生中药饮片有限公司购买 1 批); 乙腈、甲醇(色谱纯)、甲酸、乙醇等试剂(国药集团); 水晶兰苷(中国食品药品检定研究院, 批号: 111 870-201 303)。

#### 1.2 仪器

E100H 型超声波清洗仪(德国 Elma 公司); 梅特勒-托利多分析天平(METTLER TOLEDO 公司);

**[基金项目]** 海军院校建设项目(XLTJ2018009)

**[作者简介]** 张成中, 讲师, 研究方向: 中药鉴定与炮制研究, Email: zhangchzh09@163.com, Tel: (021)81871370

**[通讯作者]** 辛海量, 博士, 副教授, 硕士生导师, 研究方向: 中药鉴定、资源、药理学研究, Email: hailiangxin@163.com, Tel: (021) 81871300

GZX-9023MBE 数显鼓风干燥箱 (上海博讯实业有限公司); 超声波提取仪 (上海精密仪器仪表有限公司); FST-ID-2.0 普利菲尔超纯水机 (上海富诗特仪器设备有限公司); 赛默飞 U3000 系列液相色谱仪 (赛默飞世尔科技有限公司); 梅特勒-托利多分析天平 (METTLER TOLEDO 公司); Agilent1290 高效液相色谱仪串联 6460 三重四级杆质谱仪 (美国 Agilent 公司)。

## 2 方法与结果

### 2.1 酒制工艺的选择

#### 2.1.1 检测条件

流动相: 乙腈-0.1% 甲酸水溶液。洗脱程序: 0~2 min, 乙腈 7%→10%; 2~6 min, 乙腈 10%→45%; 6~12 min, 乙腈 45%→60%; 12~20 min, 乙腈 60%→90%; 20~22 min, 乙腈 90%; 22~24 min, 乙腈 90%→7%; 24~26 min, 乙腈 7%; 流速: 0.2 ml/min; 色谱柱: ZORBAX SB-C<sub>18</sub> 600 Bar (2.1 mm×55 mm, 1.8 μm); 柱温: 35 °C; 进样量 1 μl; 电喷雾离子源 (ESI), 负离子模式全扫描 (Scans); 雾化器压力 45 psi, 干燥器温度 300 °C, 干燥器流速 8.0 L/min, 鞘气温度 350 °C, 鞘气流速 11 L/min; 毛细管电压 3.5 kV。

#### 2.1.2 供试品制备

取净巴戟肉, 参照《中国药典》(2015 年版) 四部炮制通则 (通则 0213), 分别炮制盐制巴戟天、酒蒸巴戟天等。再取巴戟肉、盐制巴戟天、酒蒸巴戟天适量, 粉碎, 分别取 2.5 g, 加入 25 ml 乙醇, 回流加热 1 h, 冷却过滤, 作为醇提供试品溶液。另取巴戟天不同炮制品粉末各 4.0 g, 加 100 ml 纯水, 振摇 6 h 后过滤, 作为水提供试品溶液。

#### 2.1.3 巴戟天不同炮制品的质谱差异

精密吸取供试品溶液各 1 μl 注入超高效液相色谱仪, 三重四级杆质谱检测。根据质谱图中母离子的丰度, 比较几种炮制方法对巴戟天活性成分的影响, 可以发现盐制巴戟天和酒蒸巴戟天无论是醇提物还是水提物母离子的种类以及相同母离子的丰度都有较大差异, 可见酒制、盐制的炮制工艺对巴戟天所含的活性成分具有一定影响 (图 1、2)。其中, 母离子 389.0 为水晶兰苷, 可以作为主要检测成分用于优选巴戟天酒制的炮制工艺化合物指标成分。从化学成分的变化角度来说, 酒蒸后的巴戟天与盐制巴戟天及巴戟肉成分上具有一定差异, 可以作为酒制巴戟天的炮制工艺进一步研究。

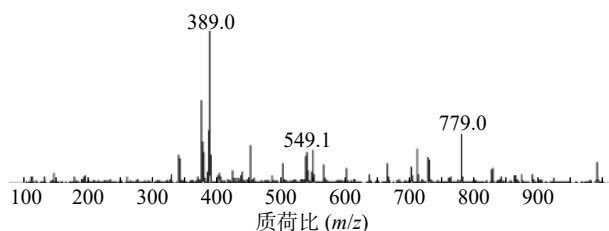


图 1 盐制巴戟天水提物全扫描质谱图

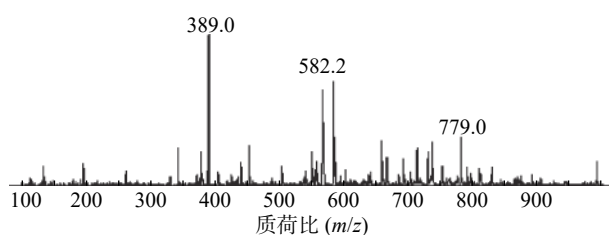


图 2 酒蒸巴戟天水提物全扫描质谱图

### 2.2 酒制巴戟天中水晶兰苷的测定

#### 2.2.1 色谱条件

色谱柱: C<sub>18</sub> 柱 (150 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-0.4% 磷酸水溶液 (5 : 95→28.8 : 71.2, 16 min); 流速为 0.9 ml/min; 检测波长为 238 nm; 进样量 20 μl。

#### 2.2.2 供试品的制备

取酒制巴戟天粉碎, 取 0.25 g, 精密称定后, 置 150 ml 具塞三角瓶中, 加入 50 ml 溶剂 [乙腈-0.1% 磷酸水 (9:1)]。超声提取 1 h 后, 用 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 即得。

#### 2.2.3 对照品储备液的制备

取水晶兰苷对照品 0.009 55 g, 精密称定, 置 25 ml 棕色容量瓶中, 加流动相溶解并定容, 制成浓度为 0.382 mg/ml 的溶液, 备用。

#### 2.2.4 标准曲线的制备

分别取对照品储备液 5、4、3、2、1 ml 置 10 ml 量瓶中, 加流动相稀释至刻度, 分别测定峰面积。绘制标准曲线, 得回归方程为:  $Y=324.83X+1.4528$ , 相关系数  $r=0.9998$ 。

#### 2.2.5 测定方法

精密量取对照品储备液 1 ml 置 10 ml 量瓶中, 加流动相稀释至刻度, 摇匀, 制成对照品溶液。分别精密量取对照品溶液和供试品溶液各 10 μl, 注入液相色谱仪, 测定 (图 3、4)。

### 2.3 酒制巴戟天炮制工艺优化

#### 2.3.1 炮制时间的影响

取巴戟天原药材 100 g, 12 份, 加固定量 10% 黄酒, 分别浸润<sup>[7]</sup>0.5、1、2、4、6、12 h 后, 蒸 1 h。按“2.2 项”所述方法测定各指标性成分水晶兰苷的含量, 通过对不同的浸润时间进行评价, 得出浸润

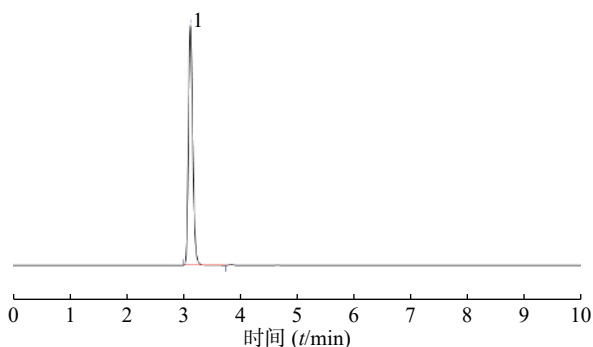


图3 水晶兰苷对照品色谱图  
1.水晶兰苷

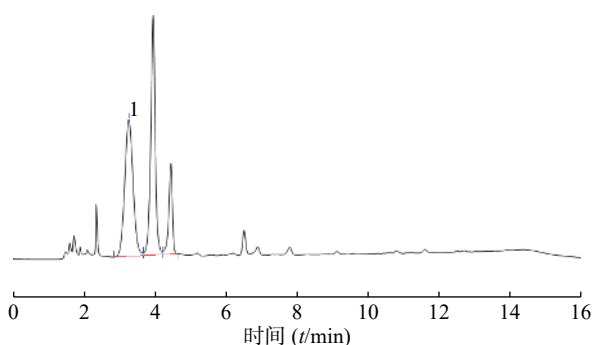


图4 酒制巴戟天样品色谱图  
1.水晶兰苷

时间为1 h最佳。

### 2.3.2 黄酒用量的影响

取巴戟天原药材 100 g, 6 份, 分别加入 5%、10%、20% 黄酒, 浸润 1 h, 蒸 1 h 后干燥。按“2.2 项”所述方法测定各指标性成分水晶兰苷的含量, 通过对黄酒不同加入量进行评价, 得出 10% 量时最佳。

### 2.3.3 效应面法优化和预测评价

应用 Design-Expert 8.0.6 软件, 绘制黄酒用量、浸润时间两个因素和水晶兰苷含量的三维效应面来确定最佳炮制工艺(图 5)。

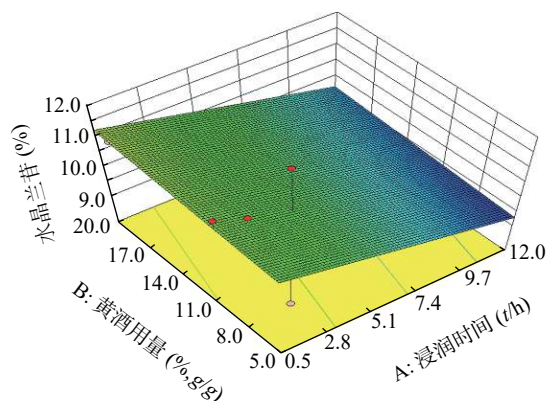


图5 酒制巴戟天效应面优化炮制工艺

比较浸润时间和黄酒用量两个因素对水晶兰苷含量的影响, 可以看出随着黄酒用量的增多, 曲

面变化较大, 而随着浸润时间的增加, 曲面趋于平缓。因此, 黄酒用量对巴戟天中水晶兰苷的量影响更大。

### 2.3.4 验证试验

根据经济效益, 生产实际并结合 Design Expert 8.0.6 软件的计算结果, 得出酒制巴戟天的最佳炮制工艺为: 加黄酒量 10%, 浸润 1 h。按照筛选出的巴戟天最佳炮制工艺条件, 重新测定原样品 3 次, 所得酒制巴戟天呈短段状; 表面灰黄色或暗灰色; 具纵纹或横裂纹; 切面皮部厚、紫色或淡紫色, 中空; 微有酒香气, 味甘微涩, 测得浓度平均值为 0.438%, 与理论预测值 0.456% 之间的相对误差  $[(\text{预测值}-\text{实际值})\div\text{预测值}]$  为 3.89% ( $<5\%$ )。

## 3 讨论

巴戟天为常用补肾阳、强筋骨、祛风湿类中药, 临床上盐制巴戟天、酒制巴戟天等炮制规格均有广泛应用, 根据中药炮制理论分析, 酒制可以增强巴戟天活血通络、祛风除湿之功, 且有利于有效成分的煎煮溶出。酒制是较早形成的巴戟天炮制方法, 且历代均有沿用, 并在明、清两代达到鼎盛时期, 巴戟天炮制方法尤其是酒制传承有序, 继承与发展并行<sup>[8]</sup>。但现行版《中国药典》并未收录酒制巴戟天, 其他地方标准中仅《广东省中药饮片炮制规范》有收载, 目前尚缺少统一明确的炮制规范及标准, 建立符合临床要求及药典规范的炮制工艺对酒制巴戟天的应用具有实际价值。钟成等<sup>[9]</sup>研究发现酒制对巴戟天中蒽醌类成分的影响与盐制相似, HPLC 检测除共有峰之外, 另有新的化合物峰出现。本实验通过 UPLC-MS 初步分析发现, 巴戟天盐制、酒制后水提液、醇提液中化合物母离子的种类以及相同母离子的丰度均有一定差异, 其中, 水晶兰苷的丰度有较大差异, 因此, 建立酒制巴戟天的炮制工艺从成分变化上看有一定的必要性, 酒制巴戟天的炮制工艺可以通过监测水晶兰苷的变化开展实验。

巴戟天中所含的水晶兰苷等环烯醚萜类成分可抑制破骨细胞抗酒石酸酸性磷酸酶 (TRAP) 活性, 降低破骨细胞的骨吸收能力, 抑制骨丢失; 减缓佐剂和 II 型胶原诱导的大鼠类风湿性关节炎的发生和骨质丢失, 显示出良好的抗骨质疏松和抗炎作用<sup>[10]</sup>。巴戟天醇提物能够减轻大鼠关节佐剂诱导的足肿胀, 降低血清中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 水平, 表现出抗炎的药理活性。水晶兰苷可通过上调大鼠软骨细胞中 II 型胶原和蛋白聚糖的表达来促进细

胞外基质合成,具有显著降低MMP-3、MMP-13表达,增强COL2A1表达的作用,显示出抑制关节软骨细胞凋亡和异化的作用<sup>[11]</sup>。本课题组研究发现水晶兰苷能够显著降低细胞炎症因子的产生,促进成骨细胞的生成,减少骨丢失<sup>[12]</sup>。巴戟天酒制的主要目的增强其祛风湿、强筋骨的功效,药理活性试验进一步证实了巴戟天中水晶兰苷对巴戟天的强筋骨、祛风湿的功效发挥了作用,因此,采用水晶兰苷而非常用的糖类作为评价巴戟天酒制炮制工艺的指标成分相对而言更为合理。

影响巴戟天酒制工艺的因素包括黄酒用量、浸润时间、蒸制时间等,优化炮制工艺时可通过单因素考察、正交试验设计法<sup>[13]</sup>、星点设计-效应面法<sup>[14]</sup>等数学模型进行选择。单因素考察仅单独考察某一个因素的影响,可用于初步预实验,但难以全面考察整体优化效果。正交试验通过合理安排试验并同时考虑几种相关因素寻找最佳因素水平组合,但很难找到一个适合的试验最优值。星点设计-效应面法是通过合理设计实验、结合实验数据结果、运用非线性数学模型进行拟合,对炮制工艺进行优化,可以拟合出各个考察因素与响应值之间的函数关系,直接看出最佳优化的效应区域<sup>[15]</sup>。笔者采用星点设计-效应面法,以黄酒用量、辅料浸润时间为考察因素,以水晶兰苷含量为评价指标,优化酒蒸巴戟天炮制工艺,得到最佳炮制工艺为黄酒用量10%,浸润1h,蒸透,干燥,所得酒制巴戟天呈短段状;表面灰黄色或暗灰色;具纵纹或横裂纹;切面皮部厚、紫色或淡紫色,中空;微有酒香气,味甘微涩;色泽均匀,质韧,无碎屑药渣。

酒制工艺优化实验过程中,蒸药时长的考察随药材的大小分档、炮制的药量变化,蒸透为度,固定规格和炮制药量时,蒸制0.5~1h几乎无差异,故本实验蒸制1h,未再设置蒸制时长的考察参数。实验中考察了酒蒸与酒炒的差异,UPLC-MS初步分析时,未见明显差异,酒炒相对于酒蒸,炮制工艺较为烦琐,翻炒、火候、出锅时机、成品性状、药材破碎等不易于量化控制,因此,本实验选择酒蒸作为酒制巴戟天的炮制工艺予以优化。

## 【参考文献】

- [1] ZHU M, WANG C, YONG G, et al. Extraction, characterization of polysaccharides from *Morinda officinalis* and its antioxidant activities[J]. *Carbohydr Polym*, 2009, 78(3): 497-501.
- [2] 何传波, 李琳, 汤凤霞, 等. 不同巴戟天多糖对免疫活性的影响[J]. *中国食品学报*, 2010, 10(5): 68-73.
- [3] CHOI J, LEE K T, CHOI M Y, et al. Antinociceptive anti-inflammatory effect of Monotropein isolated from the root of *Morinda officinalis*[J]. *Biol Pharm Bull*, 2005, 28(10): 1915-1918.
- [4] JIANG K M, HUANG D, ZHANG D W, et al. Investigation of inulins from the roots of *Morinda officinalis* for potential therapeutic application as anti-osteoporosis agent[J]. *Int J Biol Macromol*, 2018, 120(Pt A): 170-179.
- [5] 赵君, 杨欣. 巴戟天低聚糖改善不育症小鼠生殖能力的作用研究[J]. *云南中医学院学报*, 2018, 41(1): 7-10.
- [6] ZHANG H L, LI J, LI G, et al. Structural characterization and anti-fatigue activity of polysaccharides from the roots of *Morinda officinalis*[J]. *Int J Biol Macromol*, 2009, 44(3): 257-261.
- [7] 郭健. 探究不同炮制去心法对巴戟天耐糖含量的影响[J]. *中国医药指南*, 2019, 17(18): 31-32.
- [8] 伍淳操, 吴文辉, 刘霞, 等. 巴戟天酒制炮制方法研究[J]. *中华中医药杂志*, 2018, 33(1): 97-99.
- [9] 钟成, 许晓峰. 炮制方法对巴戟天蒽醌类成分指纹的影响研究[J]. *中药材*, 2012, 35(7): 1049-1053.
- [10] 沈焱, 何玉琼, 张奇, 等. 巴戟天环烯醚萜苷类成分的制备及其对破骨细胞骨吸收的抑制作用[J]. *第二军医大学学报*, 2019, 40(2): 149-156.
- [11] WANG F, WU L H, LI L F, et al. Monotropein exerts protective effects against IL-1 $\beta$ -induced apoptosis and catabolic responses on osteoarthritis chondrocytes[J]. *Int Immunopharmacol*, 2014, 23(2): 575-580.
- [12] ZHANG Z G, ZHANG Q Y, YANG H, et al. Monotropein isolated from the roots of *Morinda officinalis* increases osteoblastic bone formation and prevents bone loss in ovariectomized mice[J]. *Fitoterapia*, 2016, 110: 166-172.
- [13] 王成永, 金传山, 吴德玲, 等. 制巴戟天炮制工艺正交设计实验研究[J]. *中医药临床杂志*, 2005, 17(3): 237-238.
- [14] 史辑, 黄玉秋, 耿彤彤, 等. 星点设计-效应面法优选制巴戟天炮制工艺[J]. *中国中医药信息杂志*, 2016, 23(12): 81-85.
- [15] 曹凤媚, 李越, 许蕊蕊, 等. 星点设计-效应面优化法优选酒制丹参的炮制工艺[J]. *中医药导报*, 2019, 25(16): 55-60.

【收稿日期】 2020-03-29 【修回日期】 2020-05-29

【本文编辑】 李睿旻