

DOI 10.19656/j.cnki.1002-2406.20240302

牛膝盐炙工艺研究

张世豪, 那叶馨, 东娇娇, 胡建华, 薛金浩, 高诗雯, 杨柳[✉]

(黑龙江中医药大学, 北药基础与应用研究省部共建教育部重点实验室, 黑龙江省中药及天然药物
药效物质基础研究重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150040)

【摘要】目的:探究牛膝最佳盐炙工艺。方法:采用超高效液相色谱串联质谱技术,以牛膝补肾壮骨的5种有效成分—— β -蜕皮甾酮、25R-牛膝甾酮、25S-牛膝甾酮、人参皂苷R₀及竹节参皂苷IVa为评价指标,采用单因素和Box-Behnken设计方法,选择加盐量、炒制温度和炒制时间为考察因素,优化牛膝的盐炙工艺。结果:牛膝盐炙最佳工艺为2%加盐量,炒制温度100℃,炒制时间20 min。结论:所得牛膝盐炙工艺稳定可靠,有利于提高牛膝盐炙品的质量均一性。

【关键词】牛膝;Box-Behnken响应面法;盐炙;有效成分;超高效液相色谱串联质谱

【引用格式】

张世豪,那叶馨,东娇娇,等.牛膝盐炙工艺研究[J].中医药信息,2024,41(3):9-17.

ZHANG S H, NA Y X, DONG J J, et al. Stir-baking with salt technique of achyranthis bidentatae radix [J]. Information on TCM, 2024, 41(3):9-17.

牛膝(*Achyranthis Bidentatae Radix*)为苋科植物牛膝(*Achyranthes bidentata* Bl.)的干燥根,味苦、甘、酸,性平,归肝、肾经,具有填精补髓、益阴活血的功效,是传统滋补肝肾、强健筋骨的中药。临床主要用于治疗腰膝骨痛、四肢拘挛、筋骨无力以及痿痹等症^[1-2]。研究表明,牛膝具有多种药理作用,包括免疫系统调节、抗生育、抗肿瘤、镇痛、抗炎、抗衰老、抗骨质疏松和对心血管和神经系统作用等^[3-7]。

炮制可以改变药性,提升疗效,降低毒性。根据古籍记载,牛膝生用可散瘀血、消肿痛、引血下行,盐炙后能引药入肾,增强其补肝肾、强筋骨的作用。牛膝经不同炮制工艺炮制后,化学成分发生较大的变化,导致药理作用改变。现代牛膝常用的炮制方法为盐炙、酒炙、炒炭等,如炮制后酒牛膝可增强活血通络作用;盐牛膝能引药下行入肾,发挥补肾养精作用;牛膝炭主要发挥止血之功。2020版《中华人民共和国药典》中对于盐

炙药材的描述均是加入定量食盐(药材100 g,盐2 g),文火加热,炒干。但牛膝盐炙工艺的参数还不完善,加盐量没有针对性,炒制温度和时间也不统一,使盐炙品的内在质量难以得到有效控制,影响其临床用药的准确性,很难将药理实验结果和其物质含量差异进行联系,也不能为解读药效学差异提供帮助。

道地药材质量与炮制方法密切相关,牛膝作为我国临床常用的大宗药材之一,建立统一的、质量可控的、数字化炮制标准势在必行。因此,以课题组前期确定的牛膝补肾壮骨的有效成分—— β -蜕皮甾酮、25R-牛膝甾酮、25S-牛膝甾酮、人参皂苷R₀及竹节参皂苷IVa为评价指标^[8-9],选取加盐量、炒制温度和炒制时间为考察因素,用单因素和Box-Behnken设计方法优化牛膝的盐炙工艺。以期能够得到最佳的炮制工艺,保证牛膝的临床疗效,并为牛膝的规范化盐炙提供参考依据。

基金项目:国家自然科学基金项目(81803690);黑龙江省自然科学基金项目(LH2021H097);国家自然科学基金配套项目(2018PT02);黑龙江省青年岐黄学者培养项目;黑龙江省头雁创新团队计划项目;全国名老中医药专家传承工作室建设项目([2022]No. 75);第七批全国老中医药专家学术经验继承项目([2022]No. 76);黑龙江中医药大学研究生创新基金项目(2023yjsex034)

第一作者简介:张世豪(1998-),男,2021级药剂学专业硕士研究生。

✉通信作者简介:杨柳(1982-),女,教授,主要研究方向:中药、天然药物药效物质基础及药动学研究。

1 材料与仪器

标准品:β-蜕皮甾酮、人参皂苷R₀、竹节参皂苷IV_a(批号:5289-74-7、34367-04-9、51415-02-2,天津西玛科技有限公司);甘草素(IS)(批号:578-86-9,中国成都亚德生物科技有限公司);25R-牛膝甾酮、25S-牛膝甾酮(由本实验室从牛膝中分离纯化,并经NMR和MS谱等数据鉴定化学结构,标准品纯度均≥98%);牛膝药材(河南省,经检验符合《中华人民共和国药典》相关规定)。

超高效液相串联质谱分析仪(美国Thermo公司);超声波清洗器(KQ-5000DB,昆山市超声仪器有限公司);送风定温干燥箱(WFO-410W,上海爱朗仪器有限公司);旋转蒸发器(EYEL4 OSB-2100,东京爱朗仪器有限公司);高速粉碎机(800AD,永康市艾泽拉电器有限公司);分析天平(NewClassicMF, Mettler Toledo Switzerland公司);电热恒温水浴锅(HSS,上海博讯事

业有限公司医疗设备厂)。乙腈(Thermo Fisher Scientific)、乙酸(Dikma)均为色谱纯,其他试剂为分析纯。

2 方法与结果

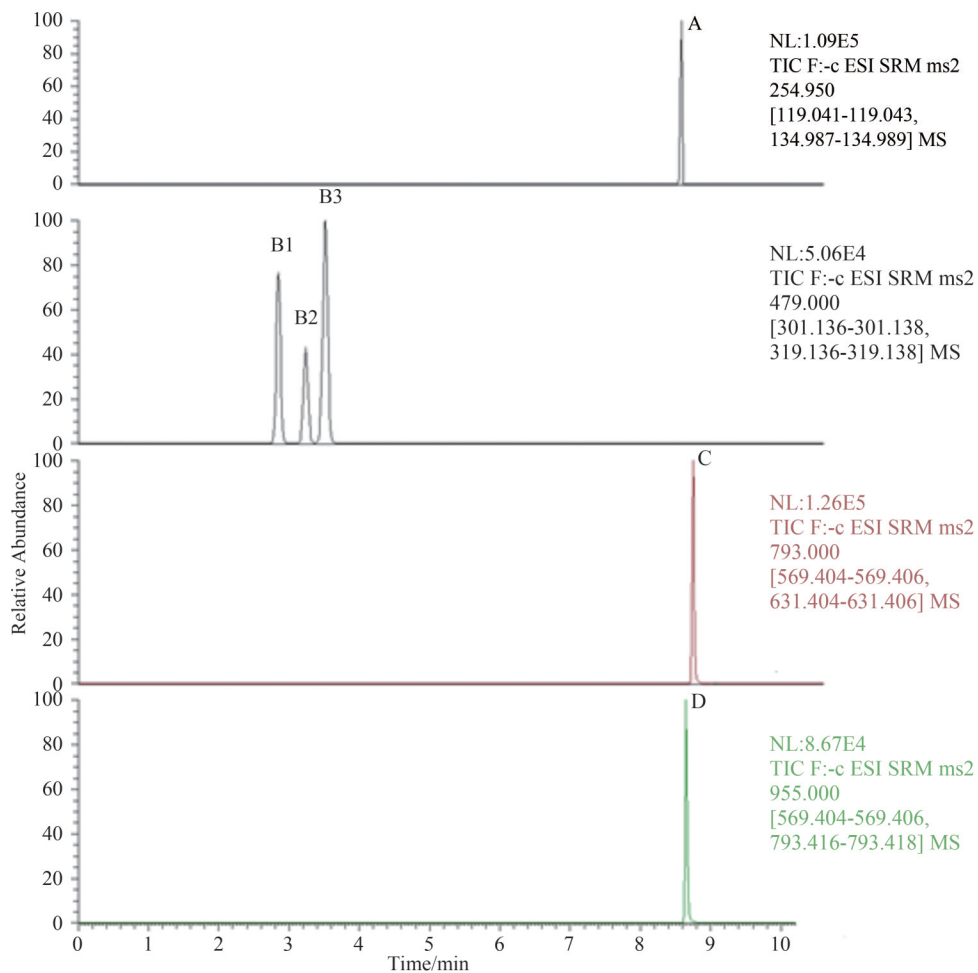
2.1 实验方法

2.1.1 色谱条件

色谱柱:Thermo Hypersil GOLD(100 mm×2.1 mm, 1.9 μm);柱温:40℃。流动相:乙腈(A%) and 0.3% 乙酸水(V/V, B%)。梯度洗脱条件见表1,总离子流图见图1。

表1 梯度洗脱条件

时间/ min	流速/ (mL/min)	乙腈/ %	0.3% 乙酸水/ (V/V, %)	进样体积/ μL
0	0.3	17	83	2
6	0.3	17	83	2
8	0.3	95	5	2



注:A为甘草素(内标);B1为β-蜕皮甾酮;B2为25R-牛膝甾酮;B3为25S-牛膝甾酮;C为竹节参皂苷IV_a;D为人参皂苷R₀。

图1 总离子流图

2.1.2 质谱条件的选择

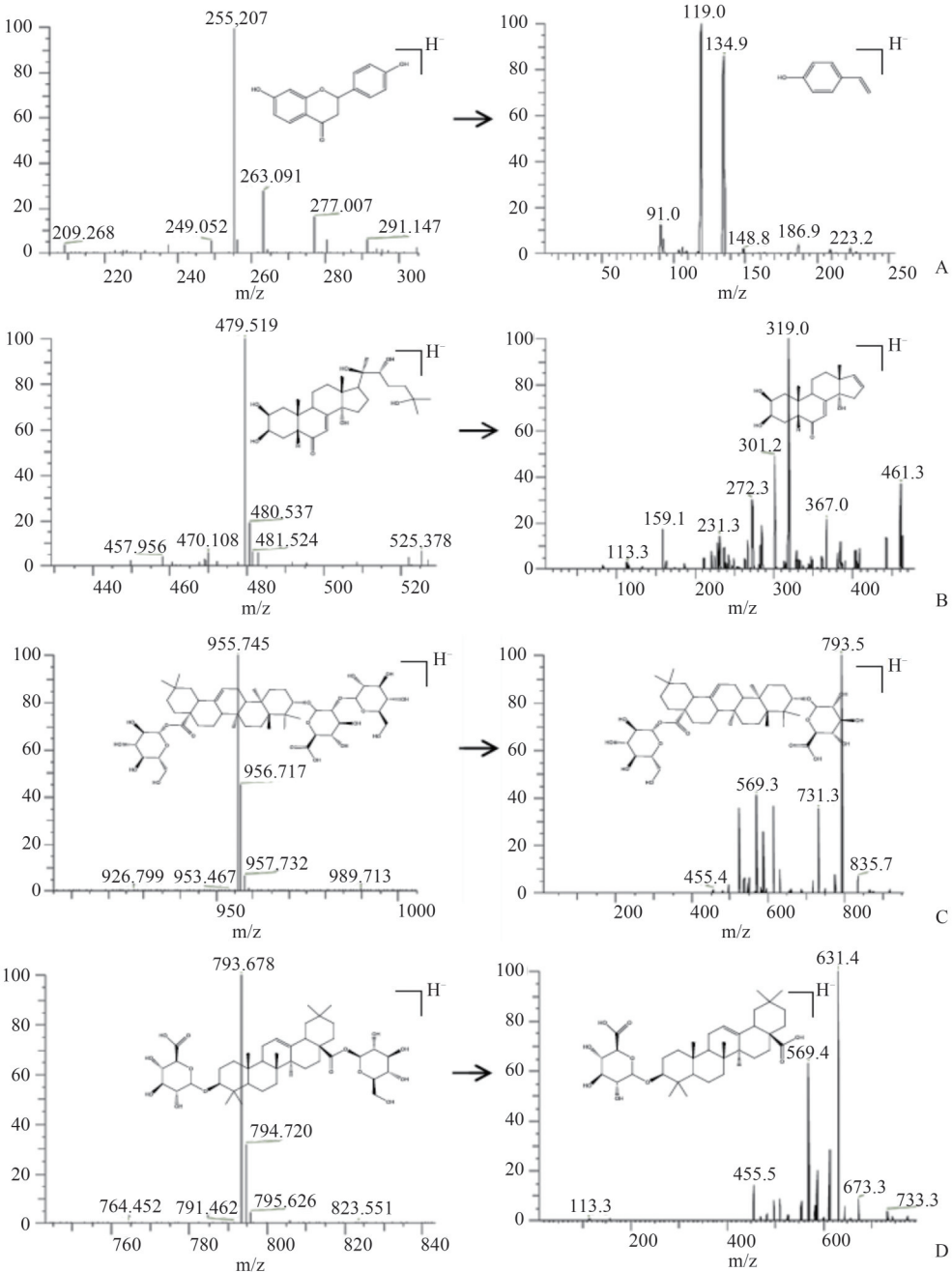
配备有电喷雾离子源的三重四级杆质谱仪,在

SRM模式下进行负离子扫描。喷射电压:-3 000 V;鞘气:30 Arb;辅助气:10 Arb;离子传输管温度:

325 ℃;蒸发器温度:350 ℃;辅助器:2 L/min;全程通入氮气。5 种有效成分及内标化合物的检测离子对及其质谱参数见表 2;5 种有效成分的代表质谱图见图 2。

表 2 5 种有效成分及内标的质谱条件

化合物名称	保留时间/min	母离子/(m/z)	子离子/(m/z)	碰撞能/V
β-蜕皮甾酮	2.85	479.519	479.519→319.0	28.54
25S-牛膝甾酮	3.24	479.519	479.519→319.0	28.54
25R-牛膝甾酮	3.52	479.519	479.519→319.0	28.54
人参皂苷 R ₀	8.65	955.745	955.745→793.5	55.00
竹节参皂苷 IVa	8.75	793.678	793.678→631.4	47.04
甘草素(IS)	8.52	255.207	255.207→119.0	25.43



注:A为甘草素(内标);B为β-蜕皮甾酮;C为人参皂苷 R₀;D为竹节参皂苷 IVa。其中 25R-牛膝甾酮、25S-牛膝甾酮与β-蜕皮甾酮为同分异构体,具有相同的母离子与子离子,所以用图 B 表示。

图 2 有效成分的代表质谱图

2.1.3 对照品溶液的制备

精密称取 5 种有效成分适量,配置成混合对照品溶液。各成分的浓度分别为:β-蜕皮甾酮 0.989 0 mg/mL、25R-牛膝甾酮 0.981 0 mg/mL、25S-牛膝甾酮 1.102 0 mg/mL、人参皂苷 R_g 0.997 0 mg/mL 以及竹节参皂苷 IVa 0.976 0 mg/mL。

2.1.4 供试品溶液的制备

牛膝样品均粉碎并筛分(60 目)。取 0.5 g 样品于烧

瓶中,浸泡于 50 mL 50% 的甲醇溶剂中,然后在 40 ℃ 水浴中超声 60 min,得供试品溶液,4 ℃ 保存待测。

2.1.5 标准曲线

以进样浓度为横坐标(*x*),以对照品和内标峰面积比为纵坐标(*y*),绘制标准曲线,计算回归方程。相关系数(*R*²)均大于 0.999 3,这表明 5 种有效成分均在其线性范围内呈现了良好的线性关系。5 种有效成分的回归方程、相关系数及线性范围结果见表 3。

表 3 5 种有效成分的回归方程、相关系数及线性范围

化合物名称	回归方程	<i>R</i> ²	线性范围/(μg/mL)	检测限/(μg/mL)	定量限/(μg/mL)
β-蜕皮甾酮	<i>y</i> =0.054 5 <i>x</i> -0.055 8	0.999 3	1.085~494.0	0.365	1.085
25S-牛膝甾酮	<i>y</i> =0.317 4 <i>x</i> -0.311 8	0.999 5	0.995~270.0	0.332	0.995
25R-牛膝甾酮	<i>y</i> =0.381 4 <i>x</i> -0.563 3	0.999 3	1.485~315.0	0.499	1.485
人参皂苷 R _g	<i>y</i> =0.458 8 <i>x</i> -0.434 3	0.999 4	0.955~210.0	0.325	0.955
竹节参皂苷 IVa	<i>y</i> =0.685 8 <i>x</i> -0.755 6	0.999 4	1.105~185.0	0.369	1.105

2.1.6 系统适应性

精密度测试,精密吸取上述供试品溶液适量,24 h 内连续测 6 次,连续测定 3 d,计算相对标准差(relative standard deviation, RSD)。结果表明各有效成分的精密度 RSD < 1.32%,表明该方法精密度良好。

重复性测试,精密称取同一批样品,记录 5 种有效成分的色谱峰面积,并计算峰面积的 RSD 值,考察方法的重现性。结果表明各有效成分的重复性 RSD < 2.60%,表明该方法重复性良好。

稳定性测试,取同一批次的供试品溶液适量,分别

于 0、4、8、16、32、48 h 进样分析,记录峰面积,考察供试品溶液在 48 h 内的稳定性。结果表明各有效成分的稳定性 RSD < 2.56%,表明该样品 48 h 内在 4 ℃ 下稳定。

利用加样回收率试验对该方法的准确性进行评价,样品中加入了已知的低、中、高 3 个浓度的标准溶液,每个浓度测定 3 份。日内、日间精度、稳定性、重复性和准确性的结果见表 4。该方法测定结果准确可靠。

回收率(%)=(测定平均值-样品值)/加入量×100%

表 4 5 种有效成分的精密度、重复性、稳定性及加样回收率试验结果

化合物名称	精密度		重复性	稳定性	回收率(<i>n</i> = 3)		
	日内	日间			低/[回收率(RSD)]	中/[回收率(RSD)]	高/[回收率(RSD)]
β-蜕皮甾酮	1.57	2.25	2.95	2.68	98.91(0.01)	99.31(0.07)	99.29(0.07)
25S-牛膝甾酮	2.46	1.51	2.25	2.54	98.98(0.47)	101.17(0.85)	98.58(1.86)
25R-牛膝甾酮	1.83	1.72	2.58	2.97	101.48(0.14)	98.68(0.42)	99.81(0.90)
人参皂苷 R _g	2.34	1.68	2.16	2.58	101.09(0.28)	100.57(0.72)	100.8(0.15)
竹节参皂苷 IVa	1.78	3.00	3.00	2.63	101.41(0.23)	99.75(0.84)	99.97(0.78)

2.2 盐炙工艺的单因素实验

2.2.1 炒制时间的单因素考察

牛膝原药材切制成 7~8 mm 小段,精密称取 6 份,每份 100 g,放于保鲜盒中,加入 2 g 食盐配成的盐水润,炒制温度为 100 ℃,炒制时间分别为 10、15、20、25、30 min,牛膝炒后粉碎过筛(60 目),样品在甲醇浓度 50%(V/V),料液比是 1:8(g/mL),提取时间为 60 min,提取次数 2 次的条件下分别进样分析。在炒制温度和加盐量一定的条件下,随着炒制时间的延长,5 种有效成分的总含量先升高后下降,过长的加热时间会导致有效成分遭到破坏致使有效成分的含量降低。当炒制时间为 20 min 时,有效成分的含量最高,因此确定最佳

炒制时间为 20 min。见图 3。

2.2.2 炒制温度的单因素考察

2 g 食盐配成的盐水润,炒制时间为 20 min,炒制温度分别为 80、90、100、110、120 ℃,牛膝炒后粉碎过筛(60 目),样品在甲醇浓度 50%(V/V),料液比为 1:8(g/mL),提取时间 60 min,提取次数 2 次的条件下分别进样分析。其中炒制温度为 100 ℃ 结果最佳。炒制时间和加盐量一定的条件下,随着炒制温度的升高,5 种有效成分的总含量先升高后下降,过高的温度会导致有效成分遭到破坏致使有效成分的含量降低。当炒制温度为 100 ℃ 时,有效成分含量最高,因此确定最佳炒制温度为 100 ℃。见图 3。

2.2.3 加盐量的单因素考察

加入 1%、2%、3%、4%、5% 的 10 mL 盐水焖润,炒制时间为 20 min,炒制温度 100 ℃,甲醇浓度 50%(V/V),料液比为 1:8(g/mL),提取时间 60 min,提取次数 2 次。

在炒制时间和炒制温度一定的条件下,随着加盐量的升高,5 种有效成分的总含量先升高后下降,加盐量为 2% 时,有效成分的含量最高,因此确定最佳加盐量为 2%。见图 3。

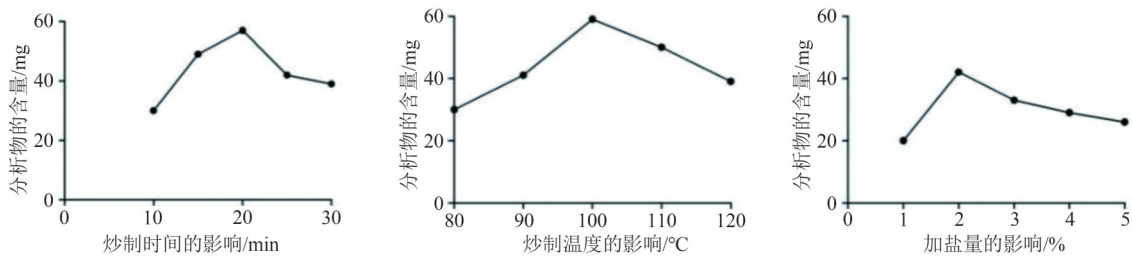


图 3 不同因素对盐炙效果的影响

2.3 盐炙工艺的响应面法

2.3.1 回归方程的建立及结果

采用基于 Box – Behnken 设计法优化牛膝盐炙工艺。在单因素试验基础上,盐炙考察因素设定为炒制温度,炒制时间,加盐量。根据响应面法设计,每个因素设 3 水平,分别以 -1.00,0.00,1.00 进行编码。代码值所代

表的实际操作物理量见表 5,试验安排及结果见表 6。

表 5 响应面法实验因素与水平

因素	自变量	-1.00	0.00	1.00
A	加盐量	1%	2%	3%
B	炒制温度	80 ℃	100 ℃	120 ℃
C	炒制时间	10 min	20 min	30 min

表 6 盐炙工艺 BBD 实验设计

序列	自变量			因变量(Dependent variables)/(mg/g)				
	A	B	C	β-蜕皮甾酮	25R-牛膝甾酮	25S-牛膝甾酮	人参皂苷 R ₀	竹节参皂苷 IV _a
1	-1	0	1	30.682	1.798	1.917	2.598	9.030
2	1	1	0	30.679	1.871	1.987	2.869	7.901
3	0	0	0	57.894	2.010	3.174	6.126	12.746
4	-1	0	-1	30.609	1.687	1.598	2.875	7.981
5	-1	-1	0	30.652	1.789	1.877	2.793	7.210
6	1	-1	0	45.687	1.997	2.078	3.043	10.339
7	0	1	1	50.838	1.966	1.645	3.980	10.284
8	0	0	0	61.451	2.213	2.846	6.699	13.036
9	-1	1	0	20.678	1.001	1.421	2.671	7.011
10	0	1	-1	50.876	1.981	2.056	3.980	10.382
11	0	0	0	60.489	2.064	3.147	6.790	13.001
12	1	0	1	50.981	1.997	2.654	3.678	10.872
13	0	-1	1	51.423	2.139	2.673	3.014	10.721
14	0	0	0	61.984	2.016	3.004	6.617	11.998
15	0	0	0	56.815	2.146	3.148	6.516	12.498
16	0	-1	-1	50.987	2.179	1.781	3.052	11.998
17	1	0	-1	47.156	2.040	2.978	3.019	10.270

2.3.2 牛膝最佳盐炙工艺的优化结果

2.3.2.1 β-蜕皮甾酮

采用 Design – Expert 软件对牛膝盐炙工艺的试验数据进行分析,得到 β-蜕皮甾酮含量对加盐量、炒制时间、炒制温度的二次多元回归模型方程 $Y = 59.73 + 7.74A - 3.21B + 0.54C - 1.26AB + 0.94AC - 0.12BC - 19.49A^2 - 8.31B^2 - 0.38C^2$ 。方差分析结果见表 7,模型决定系数 $R^2 = 0.9576$,表明该模型对实际值的模拟效果良好,试验误差小;表中 F 值和 P 值分别是 17.57

和 0.0005,表明 β-蜕皮甾酮拟合模型显著。其中,在交互项中,AB 值最大,说明加盐量和炒制温度对 β-蜕皮甾酮含量影响较大。

2.3.2.2 25R-牛膝甾酮

采用 Design – Expert 软件对牛膝盐炙工艺的试验数据进行分析,得到 25R-牛膝甾酮含量对加盐量、炒制时间、炒制温度的二次多元回归模型方程 $Y = 2.09 + 0.2A - 0.16B + 0.0016C + 0.17AB - 0.038AC - 0.0063BC - 0.31A^2 - 0.12B^2 + 0.096C^2$ 。方差分析结

果见表 8,模型决定系数 $R^2=0.9168$,表明该模型对实际值的模拟效果良好,试验误差小;表中 F 值和 P 值分别是 8.57 和 0.004 9,表明 25R-牛膝甾酮拟合模型显著。其中,在交互项中,AB 值最大,说明加盐量和炒制温度对 25R-牛膝甾酮含量影响较大。

表 7 β -蜕皮甾酮方差分析

来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值(Prob > F)
模型	2 556.48	9	284.05	17.57	0.000 5*
A	478.67	1	478.67	29.61	0.001 0*
B	82.42	1	82.42	5.10	0.058 5
C	2.31	1	2.31	0.14	0.716 8
AB	6.34	1	6.34	0.39	0.551 2
AC	3.52	1	3.52	0.22	0.655 0
BC	0.06	1	0.06	0.003 5	0.954 6
A ²	1 599.13	1	1 599.13	98.91	<0.000 1*
B ²	291.06	1	291.06	18.00	<0.000 2*
C ²	0.61	1	0.61	0.04	<0.000 3*
残差	113.18	7	16.17		
失拟项	92.69	3	30.90	6.03	0.057 6
误差	20.49	4	5.12		
总和	2 669.66	16			

注: * $P<0.05$ 。

表 8 25R-牛膝甾酮方差分析

来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值(Prob > F)
模型	1.15	9	0.13	8.57	0.004 9*
A	0.33	1	0.33	22.32	0.002 1*
B	0.21	1	0.21	13.87	0.007 4*
C	0.000 021	1	0.000 021	0.00	0.971 0
AB	0.11	1	0.11	7.36	0.030 0*
AC	0.006	1	0.006	0.40	0.547 9
BC	0.000 16	1	0.000 16	0.01	0.921 3
A ²	0.39	1	0.39	26.42	0.001 3*
B ²	0.06	1	0.06	4.06	0.083 8
C ²	0.04	1	0.04	2.62	0.149 5
残差	0.10	7	0.01		
失拟项	0.07	3	0.02	3.17	0.146 9
误差	0.03	4	0.01		
总和	1.25	16			

注: * $P<0.05$ 。

2.3.2.3 25S-牛膝甾酮

采用 Design-Expert 软件对牛膝盐炙工艺的试验数据进行分析,得到 25S-牛膝甾酮含量对加盐量、炒制时间、炒制温度的二次多元回归模型方程 $Y=3.06+0.36A-0.16B+0.059C+0.091AB-0.16AC-0.33BC-0.49A^2-0.74B^2-0.29C^2$ 。方差分析结果见表 9,模型决定系数 $R^2=0.9449$,表明该模型对实际值的模拟效果良好,试验误差小;表中 F 值和 P 值分别是 13.34 和 0.001 3,表明 25S-牛膝甾酮拟合模型显著。

其中,在交互项中,BC 值最大,说明炒制温度和炒制时间对 25S-牛膝甾酮含量影响较大。

表 9 25S-牛膝甾酮方差分析

来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值(Prob > F)
模型	5.83	9	0.65	13.34	0.001 3*
A	1.04	1	1.04	21.42	0.002 4*
B	0.21	1	0.21	4.35	0.080 0
C	0.03	1	0.03	0.58	0.469 9
AB	0.03	1	0.03	0.69	0.434 8
AC	0.10	1	0.10	2.13	0.187 9
BC	0.42	1	0.42	8.74	0.021 2*
A ²	1.00	1	1.00	20.62	0.002 7*
B ²	2.28	1	2.28	46.92	0.000 2*
C ²	0.35	1	0.35	7.27	0.030 8*
残差	0.34	7	0.05		
失拟项	0.26	3	0.09	4.54	0.089 0
误差	0.08	4	0.02		
总和	6.17	16			

注: * $P<0.05$ 。

2.3.2.4 人参皂苷 R_g

采用 Design-Expert 软件对牛膝盐炙工艺的试验数据进行分析,得到人参皂苷 R_g含量对加盐量、炒制时间、炒制温度的二次多元回归模型方程 $Y=6.55+0.21A+0.2B+0.043C-0.013AB+0.23AC+0.0095BC-2.08A^2-1.62B^2-1.42C^2$ 。方差分析结果见表 10,模型决定系数 $R^2=0.9782$,表明该模型对实际值的模拟效果良好,试验误差小;表中 F 值和 P 值分别是 34.82 和 <0.000 1,表明人参皂苷 R_g拟合模型显著。其中,在交互项中,AC 值最大,说明加盐量和炒制时间对人参皂苷 R_g含量影响较大。

表 10 人参皂苷 R_g方差分析

来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值(Prob > F)
模型	43.08	9	4.79	34.82	<0.000 1*
A	0.35	1	0.35	2.54	0.154 8
B	0.32	1	0.32	2.32	0.171 3
C	0.01	1	0.01	0.11	0.752 5
AB	0.000 68	1	0.000 68	0.004 9	0.946 0
AC	0.22	1	0.22	1.59	0.247 2
BC	0.000 36	1	0.000 36	0.002 6	0.960 6
A ²	18.30	1	18.30	133.16	<0.000 1*
B ²	11.06	1	11.06	80.48	<0.000 1*
C ²	8.52	1	8.52	61.98	0.000 1*
残差	0.96	7	0.14		
失拟项	0.70	3	0.23	3.50	0.128 6
误差	0.27	4	0.07		
总和	44.04	16			

注: * $P<0.05$ 。

2.3.2.5 竹节参皂苷Ⅳa

采用 Design - Expert 软件对牛膝盐炙工艺的试验数据进行分析,得到竹节参皂苷Ⅳa 含量对加盐量、炒制时间、炒制温度的二次多元回归模型方程 $Y = 12.66 + 1.02A - 0.59B + 0.035C - 0.56AB - 0.11AC + 0.29BC - 2.92A^2 - 1.62B^2 - 0.19C^2$ 。方差分析结果见表 11,模型决定系数 $R^2 = 0.9704$,表明该模型对实际值的模拟效果良好,试验误差小;表中 F 值和 P 值分别是 25.46 和 0.0002,表明竹节参皂苷Ⅳa 拟合模型显著。其中,在交互项中,AB 值最大,说明加盐量和炒制温度对竹节参皂苷Ⅳa 含量影响较大。

2.3.3 响应面分析因素间的相互作用

加盐量和炒制时间的交互作用与五种有效成分含量的关系的三维曲面图见图 4。随着加盐量和盐炙时间逐渐增大,5 种有效成分的含量也逐渐增大;当增大到一定水平时,5 种有效成分的含量却逐渐下降,说明加盐量和炒制时间两因素的交互作用明显。当加盐量较大时,5 种有效成分含量随着炒制温度的增大逐渐减小,见图 5。当炒制时间一定时,5 种有效成分含量

随着炒制温度的增大逐渐减小,见图 6。综上所述,盐炙因素对有效成分的含量的影响由大到小依次为:加盐量 > 炒制温度 > 炒制时间。

表 11 竹节参皂苷Ⅳa 方差分析

来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值 (Prob > F)
模型	62.79	9	6.98	25.46	0.0002 [*]
A	8.30	1	8.30	30.30	0.0009 [*]
B	2.75	1	2.75	10.03	0.0158 [*]
C	0.01	1	0.01	0.04	0.8574
AB	1.25	1	1.25	4.57	0.0698
AC	0.05	1	0.05	0.18	0.6822
BC	0.35	1	0.35	1.27	0.2972
A ²	36.01	1	36.01	131.39	<0.0001 [*]
B ²	11.00	1	11.00	40.14	0.0004 [*]
C ²	0.16	1	0.16	0.57	0.4734
残差	1.92	7	0.27		
失拟项	1.19	3	0.40	2.17	0.2338
误差	0.73	4	0.18		
总和	64.71	16			

注: * $P < 0.05$ 。

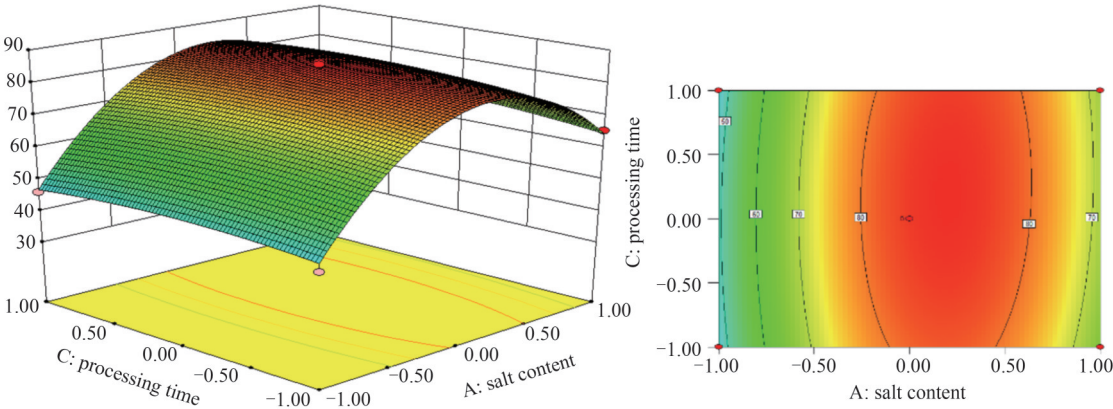


图 4 加盐量和炒制时间对有效成分的含量交互影响的三维曲面图和等高线图

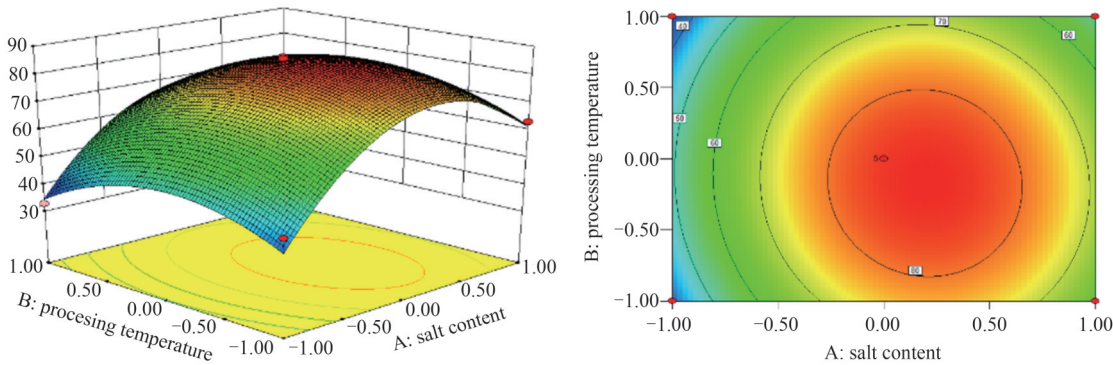


图 5 加盐量和炒制温度对有效活性成分的含量交互影响的三维曲面图和等高线图

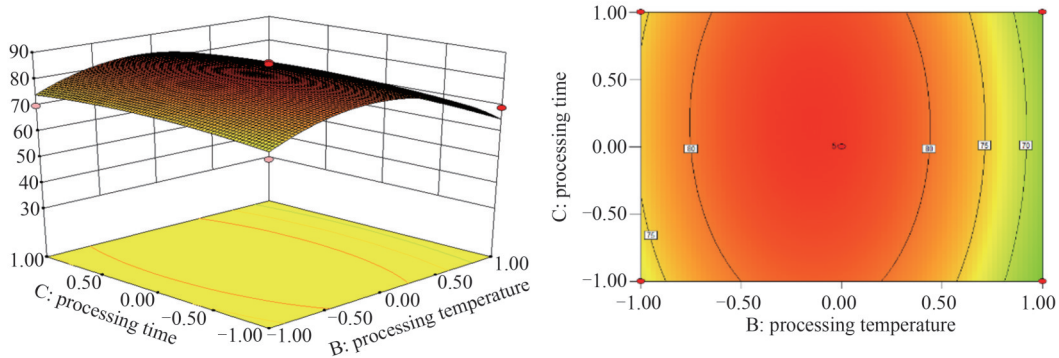


图6 炒制时间和炒制温度对有效活性成分的含量交互影响的三维曲面图和等高线图

2.4 盐炙工艺的验证实验

结合 Design – Expert, 综合分析实验可操作性等有关的各因素, 分析认为最佳盐炙工艺为 2% 加盐量, 炒制温度 100 ℃, 炒制时间 20 min。采用上述最优盐炙工艺进行验证, 重复实验 3 次, 测得的主要成分的总含量较高, 结果见表 12。说明盐炙工艺的稳定可靠, 重复性好, 可操作性强, 具有实际应用价值。

表 12 盐炙工艺验证实验结果/(mg/g)

序号	β-蜕皮甾酮	25R-牛膝甾酮	25S-牛膝甾酮	人参皂苷 R ₀	竹节参皂苷 IVa
1	61.214	2.126	3.155	6.781	13.101
2	61.249	2.144	3.135	6.774	13.078
3	61.278	2.171	3.181	6.789	13.096
平均值	61.247	2.147	3.157	6.781	13.092

3 讨论

牛膝始载于《神农本草经》, 具有补肝肾、强筋骨、逐瘀通经、引血下行之功效, 用于腰膝酸痛、筋骨无力、经闭癥瘕、肝阳眩晕等。牛膝中含有皂苷类、甾酮类、多糖类、甜菜碱和多种微量元素等, 其中以齐墩果酸型三萜皂苷、蜕皮甾酮和多糖类为其主要活性成分^[10]。盐炙理论虽论述颇多, 但仍以“入盐走肾”的理论为核心, 临床上凡是归肾经的药物多进行盐炙^[11]。历代中药盐炙方法有 14 种, 分别为盐水制、盐水润、盐水炙、盐水浸炒、盐水淹、盐水炒、盐水煮、盐水浸、盐水拌、盐水曝干、盐水煮、盐水拌炒、盐水蒸、盐水拌蒸^[12]。现代炮制方法主要以盐炙、盐蒸等为主^[13]。牛膝经盐炙后能够增强补肝肾、强筋骨之功效^[14], 而药理研究证实牛膝中甾酮类物质(主要包括 β-蜕皮甾酮, 25R-牛膝甾酮和 25S-牛膝甾酮等)有促进成骨细胞增殖作用^[15], 牛膝中皂苷类物质(主要包括竹节参皂苷 IVa、人参皂苷 R₀ 等)有抑制破骨细胞以及保护损伤软骨细胞的作用^[16-17], 这与盐牛膝补肝肾、强筋骨之效相吻合。因此本实验以课题组前期确定的牛膝补肾壮骨的 5 种有效成分——β-蜕皮甾酮, 25R-牛膝甾酮, 25S-牛

膝甾酮, 人参皂苷 R₀ 及竹节参皂苷 IVa 为评价指标进行盐炙工艺研究。

在炮制工艺设计方面, 相关的研究多是采用正交实验法和 Box – Behnken 响应面法^[18-22]。正交实验同时考虑几种相关因素, 寻找最佳因素水平组合, 但是不能给出整个区域因素和响应值之间的一个明确函数表达式, 从而无法找到最佳组合和响应值的最优值。而 Box – Behnken 实验采用多元二次方程来拟合因素和效应值之间的函数关系, 通过对回归方程的分析来寻求最优工艺参数, 解决多变量问题^[22]。因此, 本研究采用 Box – Behnken 响应面法对牛膝的盐炙工艺进行设计。

本实验采用超高效液相色谱串联质谱法, 以 β-蜕皮甾酮、25R-牛膝甾酮、25S-牛膝甾酮、人参皂苷 R₀ 及竹节参皂苷 IVa 为评价指标, 采用单因素及 Box – Behnken 设计方法, 优化牛膝的盐炙工艺。最终确定牛膝的最佳盐炙工艺为 2% 加盐量, 炒制温度 100 ℃, 炒制时间 20 min。本文建立的牛膝盐炙工艺稳定可靠, 重复性好, 可操作性强, 具有较强的实际应用价值, 有利于提高牛膝盐炙品的质量均一性, 保证临床用药的有效性, 为中药饮片的标准化和现代化提供依据。

【参考文献】

- [1] HE X, WANG X, FANG J, et al. The genus achyranthes: a review on traditional uses, phytochemistry, and pharmacological activities [J]. Journal of ethnopharmacology, 2017, 203: 260 – 278.
- [2] YANG L, HOU A J, YAN M L, et al. Investigation of radix achyranthis bidentatae phytochemistry and pharmacology [J]. World Journal of Traditional Chinese Medicine, 2019, 5(1): 50 – 60.
- [3] 王媛媛, 张雪芹, 袁菲菲, 等. 川牛膝和怀牛膝多糖抗炎免疫调节活性研究[J]. 济宁医学院学报, 2018, 41(2): 132 – 134.
- [4] 刘建华, 梁生旺, 王淑美. 牛膝皂苷栓的抗生育作用研究[J]. 河南中医学院学报, 2006, 13(1): 35, 37.
- [5] 钱钧. 从牛膝中分离的皂苷化合物抗肿瘤转移作用及机制的研究[D]. 福州: 福州大学, 2016: 4 – 40.
- [6] 邓君. 牛膝(Radix Achyranthis Bidentatae)多糖的提取纯化工艺

- 及抗衰老活性成分研究[D]. 重庆:西南师范大学,2001:3-18.
- [7] 魏元基,李峻昊,王利波,等. 牛膝活性成分 β -蜕皮甾酮通过Akt信号干预地塞米松诱导的骨细胞凋亡[J]. 中国骨质疏松杂志,2019,25(3):375-379.
- [8] YANG L, HOU A, ZHANG X, et al. TMT-based proteomics analysis to screen potential biomarkers of *Achyranthis bidentatae* radix for osteoporosis in rats[J]. Biomed Chromatogr, 2022, 36(4): e5339.
- [9] 姜海,匡海学,王秋红,等. 牛膝盐炙前后化学成分研究[C]//中华中医药学会中药炮制分会. 中华中医药学会中药炮制分会2011年学术年会论文集. 北京:中华中医药学会,2011:331-334.
- [10] 吴海燕. 牛膝类药材的化学成分与药理作用的研究进展[J]. 吉林畜牧兽医,2009,30(12):13-14,18.
- [11] HOU A, LYU J, ZHANG S, et al. Salt processing: a unique and classic technology for Chinese medicine processing [J]. Front Pharmacol, 2023, 14: 1116047.
- [12] 张景媛,鞠成国,那红宇,等. 中药盐制法历史沿革研究[J]. 亚太传统医药,2017,13(21):36-38.
- [13] 司徒奇,赵焕君. 盐制入肾对中药药性理论形成及中医临床用药的影响[J]. 亚太传统医药,2019,15(9):158-160.
- [14] 孙传鑫,郭晶,王秋红,等. 牛膝性味演变的本草考证[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(19):208-211.
- [15] 孙奋勇,潘秋辉,洪岸. 牛膝促进成骨细胞增殖的作用与机理研究[J]. 中药材,2004,27(4):264-266.
- [16] 于大永,吕晓超,史丽颖,等. 牛膝中三萜皂苷抑制破骨细胞分化作用的研究[J]. 中国中医骨伤科杂志,2011,19(3):9-10,13.
- [17] 刘晓苗. 基于“补肝肾、强筋骨”临床功效的牛膝质量评价和活性部位实验研究[D]. 郑州:河南中医药大学,2019:3-20.
- [18] CHEN Y, SUN X, FANG L, et al. Optimization of ultrasound-assisted extraction of polyphenols from *Ilex latifolia* using response surface methodology and evaluation of their antioxidant activity [J]. Molecules, 2022, 27(13):3999.
- [19] 李炳印,王君明,宋玲玲,等. 白芍药汁炙黄药子的炮制减毒工艺及其机制研究[J]. 中国中药杂志,2023,48(9):2455-2463.
- [20] 侯敏娜,侯少平,梁润丰,等. 基于响应面法结合总评归一法多指标优选蜜黄芩微波炮制工艺[J]. 天然产物研究与开发,2023, 35(3):467-476.
- [21] 黎丽,舒建龙,李凤珍,等. 正交试验优化痛风立安颗粒的提取工艺研究[J]. 壮瑶药研究,2023,7(1):81-86,309.
- [22] 梁晓莲,桂雄斌,陈勇,等. 基于层次分析法结合Box-Behnken设计响应面法优选咽喉咳合剂提取工艺[J/OL]. 中药材:1243-1248 (2023-05-24) [2023-08-22]. <https://doi.org/10.13863/j.issn1001-4454>.

(收稿日期:2023-09-21)

Stir – Baking with Salt Technique of *Achyranthis Bidentatae* Radix

ZHANG Shihao, NA Yexin, DONG Jiaojiao, HU Jianhua, XUE Jinhao, GAO Shiwen, YANG Liu[✉]
(Provincial and Ministerial Co Constructed Key Laboratory of Basic and Applied Research of Northern Medicine
of the Ministry of Education and Heilongjiang Provincial Key Laboratory of Basic Research on Effective
Substances of Traditional Chinese Medicine and Natural Medicine, Heilongjiang University of Chinese
Medicine, Harbin 150040, China)

【Abstract】 Objective: To explore the best stir – baking with salt of *Achyranthis Bidentatae* Radix. Methods: In order to optimize stir – baking with salt of *Achyranthis Bidentatae* Radix, the technique of ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry was adopted; five effective ingredients for tonifying kidney and strengthening bone of *Achyranthis Bidentatae* Radix, β – Ecdysterone, 25R *Achyranthes*, 25S *Achyranthes*, Ginsenoside R_0 , and Bamboo Joint Ginsenoside Iva, were taken as evaluation indicators; single factor and Box Behnken design methods was employed; and the amount of salt added, frying temperature, and frying time were the factors to be investigated. Results: The best technique of stir – baking with salt of *Achyranthis Bidentatae* Radix was that the amount of salt is 2%, stirring temperature 100 °C, stirring time 20 min. Conclusion: The ingredients of stir – baking with salt of *Achyranthis Bidentatae* Radix are stable and reliable, which is beneficial to the quality uniformity of *Achyranthis Bidentatae* Radix processed with salt.

【Key words】 *Achyranthis Bidentatae* Radix; Box – Behnken design – response surface methodology; Stir – baking with salt; Effective components; Ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry