不同炮制加工的熟地黄对雌性大鼠排卵功能的影响

柳祚勤，桂蜀华*，夏荃，谢友良，林好，于兵兵，李神养
（广州中医药大学 中药学院，广州 510006）

［摘要］ **目的**：探究不同炮制加工的熟地黄水煎液对雌性大鼠排卵功能的影响，为熟地黄的炮制加工与临床用药提供参考。**方法**：分别采用清蒸法（一蒸一晒）和传统法（九蒸九晒）炮制生地黄，得到 2 种不同炮制工艺的熟地黄。以动情周期正常的雌性成年大鼠为研究对象，设空白组和清蒸组、传统组。观察这 2 种熟地黄的水煎液对雌性大鼠动情周期、卵巢组织形态及血清激素水平的影响，清蒸组和传统组的给药剂量均为 3.6 $g \cdot kg^{-1}$。建立熟地黄的 HPLC 指纹图谱，并结合药效学指标研究熟地黄对雌性大鼠排卵功能影响的差异。**结果**：与空白组比较，清蒸组大鼠血清中雌二醇和孕酮含量明显降低（$P<0.05$），动情周期明显延长（$P<0.05$），卵巢中闭锁卵泡数目明显升高（$P<0.05$）；传统组各项指标变化皆不明显，与空白组相比无统计学差异。谱效学结果显示毛蕊花糖苷与清蒸法制备的熟地黄抑制大鼠排卵作用呈正相关；传统法制备的熟地黄 HPLC 图谱中 3，5 号峰与抑制排卵作用呈负相关。**结论**：清蒸法炮制的熟地黄对正常雌性大鼠的排卵有一定抑制作用，传统法炮制的熟地黄在排卵功能方面有一定优势。

［关键词］ 熟地黄；炮制；抑制排卵；指纹图谱；毛蕊花糖苷；5-羟甲基糠醛；雌二醇
［中图分类号］ R22；R943.1；R283；R284；R285 ［文献标识码］ A ［文章编号］ 1005-9903(2018)13-0006-06
［doi］ 10.13422/j.cnki.syfjx.20181302
［网络出版地址］ http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180412.0846.003.html
［网络出版时间］ 2018-04-12 10:33

Effect of Rehmanniae Radix Praeparata Processed with Different Techniques on Ovulation Function of Female Rats

LIU Zuo-qin, GUI Shu-hua*, XIA Quan, XIE You-liang, LIN Hao, YU Bing-bing, LI Shen-yang
(*School of Pharmacentical Sciences*, *Guangzhou University of Chinese Medicine*, *Guangzhou* 510006, *China*)

［**Abstract**］ **Objective**: To explore the influence of Rehmanniae Radix Praeparata decoction processed with different techniques on the ovulation function of female rats, and to provide reference for the processing and clinical use of this decoction pieces. **Method**: Steamed method (one steaming and one drying) and traditional method (nine steaming and nine drying) were used to prepared Rehmanniae Radix Praeparata, respectively. Female adult rats with a normal estrus cycle were selected as study subjects, blank group, steaming group and traditional group were set up. The effects of two Rehmanniae Radix Praeparata decoctions on the estrous cycle, ovarian tissue morphology and serum hormone levels in female rats were observed. The doses in the steaming group and the traditional group were 3.6 $g \cdot kg^{-1}$. The HPLC fingerprints of Rehmanniae Radix Praeparata was established, fingerprints and pharmacodynamic indexes were used to investigate effect of Rehmanniae Radix Praeparata on ovulation of female rats. **Result**: Compared with the blank group, serum estradiol and progesterone levels in the steaming group were significantly decreased ($P<0.05$), the estrous cycle was significantly prolonged ($P<0.05$), and the number of atresia follicles in the ovary was significantly increased ($P<0.05$); the change of each index in the traditional group was not obvious. Verbascoside and effect of inhibiting ovulation of

［收稿日期］ 20171113(001)
［基金项目］ 广东省自然科学基金项目(S2012010010131)
［第一作者］ 柳祚勤，在读硕士，从事中药复方新药开发与研究，E-mail：1139628751@qq.com
［通信作者］ *桂蜀华，博士，副教授，从事中药复方新药开发与研究，E-mail：gjl615@gzucm.edu.cn

Rehmanniae Radix Praeparata processed steamed method in rats positively correlated; peak 3 and 5 in HPLC fingerprints of Rehmanniae Radix Praeparata processed with traditional method were negatively correlated with inhibition of ovulation. **Conclusion**: Rehmanniae Radix Praeparata processed by steamed method has a certain inhibitory effect on ovulation of normal female rats. Rehmanniae Radix Praeparata processed by traditional method has some advantages in ovulation function.

[**Key words**] Rehmanniae Radix Praeparata; processing; inhibition of ovulation; fingerprint; verbascoside; 5-hydroxymethylfurfural; estradiol

熟地黄,味甘,性微温,归肝、肾经,具有补血滋阴、益精填髓的功效,临床用于治疗肝肾阴虚、腰膝酸软、骨蒸潮热、盗汗遗精、内热消渴、血虚萎黄、心悸怔忡、月经不调、崩漏下血、眩晕、耳鸣、须发早白[1],历代本草均有记载,据统计其在中药处方中的使用频率排名处于前 10 位,为常用滋补类中药之一[2]。

熟地黄是由生地黄经炮制加工而成,炮制方法大致分为清蒸制、黄酒制、砂仁制等。以清蒸法为例,有隔水蒸制 6,8,12,24 h 等不同方法,还有部分药厂采用高温高压法蒸制。本实验在参考 2015 年版《中国药典》,文献报道[3-7]和广东省部分药厂提供的炮制规范后,选定较为普遍的隔水清蒸 12 h,烘箱 55 ℃干燥法为本研究的清蒸法炮制工艺。历代本草对熟地黄的炮制记载颇多,如明·李时珍《本草纲目》记载"熟地黄需九蒸九晒为止"。中医认为九蒸九晒炮制法实质是 9 次水火共制(曝晒为火制),蒸法促其腐熟而有补阴血之功,曝晒则吸收天地阴阳之气,使生者变熟,阴而不凝,濡而不滞,无凉遏之弊,有流动之能,正符合肾之"阴中涵阳"特征[8-10]。在广州中医药大学数理工程研究院谢有良助理研究员与中药学院炮制学教研室夏荃副教授的指导下,根据中医古籍记载,采用九蒸九晒法为传统法炮制工艺。

本研究在临床实践中发现,四物汤治疗月经周期正常的妇科患者时,若仅以四物汤加减,熟地黄 > 30 g,有部分患者会出现排卵延迟或不排卵现象。据调查显示,市面上熟地黄饮片多采用焖法一次性蒸制和烘箱干燥而来,普遍存在蒸不透、口味甜中发酸、疗效差、容易腻胃等问题,而中医古籍中记载的九蒸九晒熟地黄则具有"黑如漆,亮如油,甘之饴"等优点。故推测临床上发现部分患者出现排卵障碍现象可能与熟地黄的炮制加工方法有关。本实验以中医临床实践观察为立题基础,对同批生地黄药材按照清蒸法和传统法进行炮制,通过检测大鼠动情周期、闭锁卵泡数目、雌二醇和孕酮水平等药效学指标来考察 2 种熟地黄水煎液对正常雌性大鼠排卵功能的影响;建立这 2 种熟地黄的指纹图谱,采用谱效结合手段探究化学成分差异与药效之间的联系,探讨不同方法炮制的熟地黄对大鼠排卵功能影响的物质基础。

1 材料

LC-20AT 型高效液相色谱仪(日本岛津公司),Multiskan GO 型全波长酶标仪(英国 Thermo Fisher Scientific 公司),BX41 型显微镜(日本奥林巴斯公司),GL-21M 型高速冷冻离心机(上海卢湘仪离心机仪器有限公司),XS205 型 1/10 万电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司)。

生地黄购于河南省武陟县谊新中药材有限公司,经广州中医药大学中药学院吴文如副教授鉴定为玄参科植物地黄 *Rehmannia glutinosa* 的干燥块根;大鼠雌二醇(E2)试剂盒、大鼠孕酮(P)试剂盒均购自天津安诺瑞康生物技术有限公司,10% 甲醛和苏木精-伊红(HE)染色液均购自天津寰宇精细化工有限公司,生理盐水(四川科伦药业股份有限公司,国药准字 43020993,规格 500 mL),毛蕊花糖苷和 5-羟甲基糠醛对照品[阿拉丁试剂(上海)有限公司,批号分别为 D1707067 和 C1607089,纯度均 ≥ 98%],甲醇、乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

SPF 级雌性 SD 大鼠购于广州中医药大学实验动物中心,体质量(200 ± 20) g,合格证号 SCXK(粤)2015-0020。本实验涉及的动物实验经广州中医药大学实验动物伦理委员会批准,批准号 44005900002467。

2 方法与结果

2.1 药材的炮制与含量检测

2.1.1 熟地黄的制备 将生地黄 1 kg 平均分成 2 份。1 份采用清蒸法炮制[3-7],即蒸制 1 次(12 h),取出,放入烘箱内 55 ℃干燥 10 h 至不粘手,切厚片。另外 1 份选择传统法炮制[8-10],即将生地黄置笼屉内用武火加热,用容器收集流出的地黄汁,蒸 6 h至地黄中央发虚为度,取出后置于日照充足的地

方,自然凉晒 1 d,拌入地黄汁,蒸 6 h 后取出,晒 1 d;反复蒸晒 8 次,第 9 次蒸至内外漆黑,味甜、酸、无苦味为度。取出晒至八成干,切斜片。经传统法炮制而得的熟地黄,其表面呈乌黑色,有光泽,黏性大;质柔软而带韧性,不易折断,断面乌黑色,有光泽;气微,味甜。经清蒸法炮制而得的熟地黄,其表面呈乌黑色,无光泽,有轻微的黏性;质柔软,带韧性,不易折断,断面乌黑色,无明显光泽;气微,味微甜。

2.1.2 毛蕊花糖苷的含量测定 色谱条件为 Kromasil C_{18}色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相乙腈-0.1%乙酸水溶液(16∶84),检测波长设定 334 nm,进样量 20 μL。精密称取 2 种熟地黄粗粉 2.0 g,置圆底烧瓶中,精密加入甲醇 100 mL,称定质量,加热回流 30 min,放冷,再称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,精密量取续滤液 50 mL,减压回收溶剂近干,残渣用流动相使溶解并转移至 10 mL量瓶中,加流动相稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,得供试品溶液。取毛蕊花糖苷对照品适量,精密称定,加流动相溶解并稀释到刻度,分别制成质量浓度 2.5,5,10,20,30,40 mg·L^{-1}的对照品溶液。分别精密吸取上述毛蕊花糖苷对照品溶液 1 mL,过 0.22 μm 微孔滤膜,按上述色谱条件测定,以峰面积为纵坐标,质量浓度为横坐标,得毛蕊花糖苷回归方程 $Y = 6.223\ 2X - 6.929\ 2$($r = 0.997$),线性范围 2.5~40 mg·L^{-1}。计算清蒸法和传统法熟地黄中毛蕊花糖苷的质量分数分别为 0.097% 和 0.033%,均 >0.02%,符合 2015 年版《中国药典》的规定,说明 2 种熟地黄成品合格。

2.2 不同熟地黄提取物对大鼠排卵功能的影响

2.2.1 药液制备与分组给药 将 2 种熟地黄炮制品剪碎(过四号筛,下同),分别称取 200 g,第 1 次加 8 倍量水室温浸泡 30 min,煎煮 2 h,收集滤液,残渣加 6 倍量水煎煮 1 h,过滤,合并滤液,加热浓缩成生药质量浓度为 1 g·mL^{-1}的水煎液,4 ℃冰箱保存备用。18 只雌性大鼠随机分为 3 组,分别记为传统组、清蒸组、空白组,每组 6 只。阴道涂片观察 1 个动情周期后给药,每天给药 1 次,共给药 24 d,自由饮食。给药组分别按剂量 3.6 g·kg^{-1}灌胃熟地黄水煎液,空白组给予等量生理盐水。

2.2.2 动情周期检测 每只大鼠每日进行阴道涂片观察,记录动情周期,显微镜下观察阴道表皮细胞形态,观察 30 d,连续记录 4 个动情周期。给药前,动物正常动情周期 4~5 d。给药 7 d 后清蒸组动情周期出现紊乱,出现延长的现象。空白组和传统组动情周期维持稳定,采用 SPSS 18.0 软件进行单因素方差分析,$P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。见表 1。

表 1 不同工艺炮制的熟地黄对大鼠动情周期、血清中雌二醇和孕酮水平的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

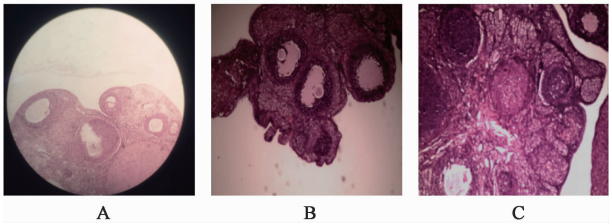
Table 1 Effect of Rehmanniae Radix Praeparata processed by different technology on estrous cycle, estradiol and progesterone levels in serum of rats($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	动情周期/d				E_2/pmol·L^{-1}	P/pmol·L^{-1}
	第 1 个	第 2 个	第 3 个	第 4 个		
空白	4.50 ±0.18	4.50 ±0.18	4.50 ±0.18	4.50 ±0.18	17.21 ±0.19	5.39 ±0.11
传统	4.33 ±0.17	4.17 ±0.14	4.33 ±0.17	4.17 ±0.14	17.36 ±0.24	5.41 ±0.19
清蒸	4.50 ±0.18	5.83 ±0.48[1)]	7.00 ±0.42[1)]	7.17 ±0.39[1)]	10.69 ±0.22[1)]	3.08 ±0.30[1)]

注:与空白组比较[1)] $P < 0.05$(表 3 同)。

2.2.3 卵泡形态检测 给药 24 d 后,处死大鼠,腹主动脉取血,常规分离血清,-20 ℃冰箱保存。取卵巢,10%甲醛保存,送往广州中医药大学第一附属医院病理科进行切片观察。将制作好的 HE 染色切片置于光学显微镜下 40 倍观察,用 BX41 型显微镜拍照,观察卵泡的形态。结果发现传统组和空白组的卵泡形态正常,黄体和次级卵泡清晰可见。清蒸组卵泡形态多次出现闭锁,呈闭合状态,且黄体和次级卵泡模糊不清,见图 1。清蒸组、传统组、空白组闭锁卵泡数分别为(4.0 ±0.6),(2.2 ±0.5),(2.3 ±0.5)个。利用 SPSS 18.0 软件进行数据处理,结果发现传统组和空白组比较,闭锁卵泡数目无明显差异;而清蒸组的闭锁卵泡数目明显大于传统组和空白组($P < 0.05$)。

2.2.4 雌二醇(E_2)和孕酮(P)检测 见表 1。结果传统组与空白组比较,雌二醇和孕酮含量无明显差异;清蒸组分别与传统组和空白组相比较,雌二醇和孕酮的含量均有明显下降($P < 0.05$)。



A. 空白组;B. 传统组;C. 清蒸组

图 1　不同工艺炮制的熟地黄对大鼠卵巢卵泡形态的影响(HE, ×40)

Fig. 1　Effect of Rehmanniae Radix Praeparata processed by different technology on morphology of ovarian follicles in rats (HE, ×40)

2.3　HPLC 指纹图谱的建立

2.3.1　色谱条件　Kromasil C_{18} 色谱柱(4.6 mm × 250 mm,5 μm),流动相乙腈(A)-0.02% 磷酸溶液(B)梯度洗脱(0 ~ 5 min,1% ~ 1.5% A;5 ~ 12 min,1.5% ~ 3% A;12 ~ 17 min,3% ~ 7% A;17 ~ 50 min,7% ~ 9.5% A;50 ~ 70 min,9.5% ~ 12.5% A;70 ~ 90 min,12.5% ~ 18% A;90 ~ 120 min,18% ~ 21% A;120 ~ 130 min,21% ~ 25% A;130 ~ 140 min,25% ~ 29% A;140 ~ 145 min,29% ~ 38% A;145 ~ 150 min,38% ~ 45% A;150 ~ 155 min,45% ~ 65% A;155 ~ 160 min,65% ~ 100% A;160 ~ 180 min,100% A),流速 1 mL·min^{-1},检测波长 334 nm,柱温 35 ℃。

2.3.2　对照品溶液的制备　精密称定毛蕊花糖苷和 5-羟甲基糠醛对照品各 1.0 mg,分别置于不同 5 mL量瓶中,加水定容至刻度,得对照品溶液。分别抽取上述 2 种对照品溶液 1 mL 于 5 mL 量瓶中,加水稀释并定容至刻度,得混合对照品溶液,于 4 ℃冰箱贮存。

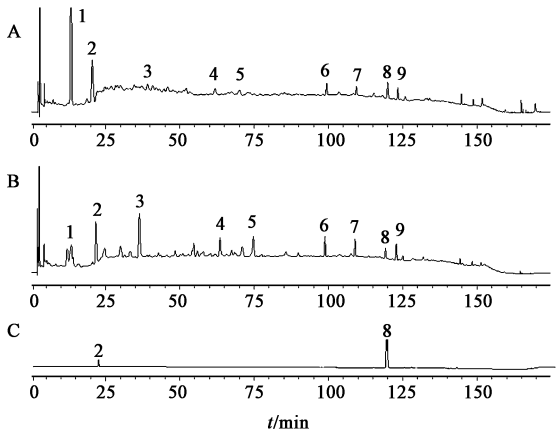
2.3.3　供试品溶液的制备　取熟地黄饮片 6 g,剪碎后称定,置于圆底烧瓶中,加水 50 mL,冷凝回流 2 h,过滤,收集滤液后加入无水乙醇至含醇量达 80%,置于 4 ℃冰箱过夜,次日过滤,收集滤液,减压蒸馏至近干,加入 60% 甲醇溶解并定容于 10 mL 量瓶中,密塞,摇匀,进样前用 0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得[11]。

2.3.4　精密度试验　取同一批供试品溶液 20 μL,按 **2.3.1** 项下色谱条件连续进样 6 次,记录色谱图,以毛蕊花糖苷色谱峰为参照峰,结果各共有峰相对保留时间、相对峰面积的 RSD 分别为 0.4% 和 1.0%,表明仪器精密度良好。

2.3.5　稳定性试验　取同一批供试品溶液 20 μL,分别于 0,3,6,9,12,24 h 按 **2.3.1** 项下色谱条件测定,记录指纹图谱,以毛蕊花糖苷色谱峰为参照峰,结果各共有峰相对保留时间、相对峰面积的 RSD 分别为 0.4% 和 1.3%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.3.6　重复性试验　取同一批次样品,按 **2.3.3** 项下方法平行制备 6 份供试品溶液,按 **2.3.1** 项下色谱条件进样,记录指纹图谱,以毛蕊花糖苷色谱峰为参照峰,结果各共有峰相对保留时间、相对峰面积的 RSD 分别为 0.6% 和 1.1%,表明该方法重复性良好。

2.3.7　熟地黄指纹图谱的建立与共有峰的标定　取 2 种熟地黄供试品溶液,按 **2.3.1** 项下色谱条件测定,记录色谱图,将数据导入"中药色谱指纹图谱相似度评价系统"(2004A 版)软件,采用中位数矢量法进行多点校正生成熟地黄指纹图谱及共有模式,确定共有峰 9 个,见图 2。通过与对照品的色谱图进行比较,确定其中 2 号峰为 5-羟甲基糠醛,8 号峰为毛蕊花糖苷。各色谱峰的出峰时间和峰面积见表 2。



A. 清蒸组样品;B. 传统组样品;C. 混合对照品;2. 5-羟甲基糠醛;8. 毛蕊花糖苷

图 2　不同工艺炮制的熟地黄的 HPLC 指纹谱

Fig. 2　HPLC fingerprints of Rehmanniae Radix Praeparata processed by different technology

2.4　HPLC 指纹图谱与抑制排卵药效作用的相关性分析　将表 1 与表 2 的数据代入 SPSS 18.0 软件中作双变量相关分析法处理,结果显示有 6 个色谱峰与动情周期延长呈正相关(与抑制排卵呈正相关),分别是色谱峰 1,2,6 ~ 9,第 1 个动情周期内动物均未给药,无参考意义。其中 1 号峰和 8 号峰(毛蕊花糖苷)的相关系数 > 0.7,说明二者的相关性较大。2 号峰为 5-羟甲基糠醛,相关系数介于 0.5 ~

表 2　清蒸组与传统组熟地黄水提物不同色谱峰的平均峰面积（$n=3$）

Table 2　Average peak area of different peaks of Rehmanniae Radix Praeparata aqueous extract from steaming group and traditional group（$n=3$）

峰号	t_R/min	清蒸组	传统组
1	14.029	3 740 806	768 269
2	22.021	1 111 912	822 878
3	36.796	170 360	1 180 324
4	63.872	215 278	437 828
5	74.842	38 296	573 212
6	99.398	203 219	291 504
7	109.410	163 271	247 353
8	119.779	299 416	170 089
9	123.285	187 119	221 621

0.7，与抑制排卵有一定相关性。有 3 个峰与动情周期呈负相关，分别是 3～5 号峰；其中 3，5 号峰具有显著意义，相关性较大，推测可能是传统法制备的熟地黄中有促进排卵的有效成分。见表 3。

表 3　熟地黄各色谱峰与大鼠动情周期变化的 Pearson 相关系数

Table 3　Pearson correlation coefficients between peaks of Rehmanniae Radix Praeparata and change in estrus cycle of rats

峰号	第 1 个	第 2 个	第 3 个	第 4 个
1	0.322	0.927[1)]	0.969[1)]	0.956[1)]
2	−0.267	0.554	0.660	0.625
3	−0.991[1)]	−0.548	−0.431	−0.472
4	−0.871	−0.198	−0.065	−0.111
5	−0.998[1)]	−0.608	−0.497	−0.536
6	−0.733	0.034	0.167	0.122
7	−0.761	−0.007	0.127	0.081
8	−0.078	0.702	0.791	0.763
9	−0.620	0.187	0.317	0.273

3　讨论

中药炮制是我国中医药研究的一个重要组成部分，从源头上影响着临床的药效。熟地黄经过不同方法炮制后，药物性能会发生转变，进而产生不同的功效[12]。本文是建立在文献研究与实地考察的基础上，采用清蒸法和传统法工艺炮制熟地黄，主要研究其对大鼠排卵功能的影响，以揭示炮制工艺对该药药效的影响，为阐释传统法炮制的意义提供了一定科学依据。

近年来，熟地黄补肾功效研究多集中在含熟地黄中药复方的临床疗效考察上，对熟地黄炮制工艺影响人或动物排卵功能方面的谱效学研究较少。研究表明卵泡闭锁是卵泡黄素化的表现，会引起不孕不育，同时伴有月经周期不正常现象。E_2 是雌激素中最主要、活性最强的激素，是性腺功能启动的标志。P 是在促进女性附性器官成熟及第二性征时出现并维持正常性欲及生殖功能的激素[13]。因此血清中 P 和 E_2 含量的降低是排卵延迟现象的重要标志。本研究结果表明清蒸法（一次性蒸制 12 h，烘箱 55 ℃干燥 10 h）熟地黄水煎液在 3.6 $g\cdot kg^{-1}$ 剂量下能明显延长动情周期，显著降低血清中 P 和 E_2 的含量，导致卵巢中闭锁卵泡数目明显增加。提示清蒸法炮制的熟地黄对正常雌性大鼠的排卵有一定抑制作用，传统法炮制的熟地黄在排卵功能上有一定优势。

研究表明熟地黄随着炮制程度加深，多糖和部分环烯醚萜苷类成分会因降解而减少，例如梓醇、毛蕊花糖苷。毛蕊花糖苷是从肉苁蓉中首次提取，有研究者认为其具有补肾助阳的功效，是熟地黄补肾有效成分之一[14-16]。5-羟甲基糠醛含量会随着炮制次数增加而逐渐升高，是多糖或多聚糖在蒸晒过程中发生美拉德反应而生成的新产物。目前，关于 5-羟甲基糠醛具体作用尚存争议。但许多中药经炮制加热后会产生 5-羟甲基糠醛或使其含量增加[17-19]。本实验结果表明 1 号峰（成分未知），2 号峰（5-羟甲基糠醛），8 号峰（毛蕊花糖苷）与抑制排卵具有较大相关性；3，5 号峰与抑制排卵呈负相关，但物质成分不明。提示清蒸法炮制的熟地黄可能存在抑制排卵的成分，以毛蕊花糖苷的可能性为最大。同时，传统法炮制的熟地黄也可能存在促进排卵的有效成分，但清蒸法炮制的熟地黄中毛蕊花糖苷与 5-羟甲基糠醛的含量是否确切影响了大鼠的排卵功能还有待后续细胞实验去证实。为探究与抑制排卵呈负相关的未知成分，后续将采用液质联用技术和核磁共振技术进行检测。

［参考文献］

［1］　国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部［M］. 北京：中国医药科技出版社，2015：124-126.

［2］　徐定华. 地黄的加工炮制工艺及质量评价研究［D］. 洛阳：河南科技大学，2011.

［3］　邓寒霜，王新军. 熟地黄加工炮制方法研究［J］. 商洛师范专科学校学报，2005，19（3）：116-118.

［4］　于维萍，孙萍，孙洪胜，等. 地黄的炮制方法及其对化学成分和药理作用的影响［C］//中华中医药学会. 第

六届中药炮制学术会议论文集:2006 年卷. 北京:中国学术期刊(光盘版)电子杂志社,2006:278-282.

[5] 卢鹏伟. 地黄的化学成分和炮制的比较研究[D]. 郑州:河南大学,2008.

[6] 郭艳霞. 美拉德反应与地黄炮制机理的关系[D]. 济南:山东大学,2012.

[7] 李更生,刘明,王慧森,等. 地黄药材炮制过程中环烯醚萜苷类成分动态变化的研究[J]. 中国中医药科技,2008,15(6):440-442.

[8] 尚志均.《本草经集注》概述[J]. 安徽中医学院学报,1983,5(2):51-52.

[9] 张成俊,周澜.《雷公炮炙论》经典炮制方法及研究[J]. 现代中药研究与实践,2007,22(3):50-52.

[10] 林维启.《金匮要略方论》用药特点[J]. 甘肃中医学院学报,1987(3):8-9.

[11] 胡律江,胡志方,王小平,等. 江西建昌帮炆熟地黄的 HPLC 指纹图谱[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(23):33-36.

[12] 赵丹,张振凌,王胜超,等. 不同方法炮制的熟地黄的补血作用比较[J]. 中国实验方剂学杂志,2017,23(19):46-49.

[13] 史小林,许晴,李卫红,等. 成年与胚胎大鼠卵泡细胞的体外研究[J]. 首都医科大学学报,1998,19(3):201-204.

[14] 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.

[15] SHI S F, YU C Q. Progress in research on phytoestrogens and their effect targets[J]. J Chin Integr Med, 2005, 3(5):408-410.

[16] XIAO L, ZHAO X G, CHANG S M. Developmental anatomy of the root tuber of *Rehmannia glutinnsa*[J]. Acta Bot Boreal Occident Sin, 1996, 16(5):10-12.

[17] 李娴,王娜,卫向龙. 熟地黄炭补血止血作用的炮制机制探索[J]. 中国实验方剂学杂志,2017,23(4):29-33.

[18] 刘鹤香,肖振民,常东明,等. 怀地黄不同提取物的药理作用及有效部位分析[J]. 新乡医学院学报,1989,6(4):228-230.

[19] 李更生,王慧森,刘明,等. 地黄中环烯醚萜苷类化学成分的研究[J]. 中医研究,2008,21(5):17-19.

[责任编辑　刘德文]