

基于多指标评价优选草珊瑚炮制工艺

温 柔, 李 潮, 严丽萍, 张崇佩, 张依欣, 龚千锋*, 于 欢*

江西中医药大学药学院, 江西 南昌 330004

摘 要: 目的 运用层次分析法(AHP)建立一种中药多指标的综合评价方法, 优选草珊瑚最佳炮制工艺。方法 在单因素实验基础上, 通过 AHP 以新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、异嗪皮啶、落新妇苷、迷迭香酸含量的综合评分为评价指标, 以烘干温度、烘干时间为影响因素, 通过单因素考察确定草珊瑚叶的净制工艺; 以浸泡时间、闷润时间、切制长度、烘干温度为影响因素, 通过星点设计-效应面法优选草珊瑚茎的最佳切制工艺; 利用多指标 AHP 对优选工艺进行分析与验证。结果 草珊瑚茎最佳炮制工艺为茎抢水洗净 1 次, 12 倍量水浸泡 1 h, 闷润软化 3 h, 取出后切制成 15 mm 的段, 于 50 °C 烘 2 h; 叶的炮制方法为叶抢水清洗 1 次, 置 50 °C 干燥 4 h; 再将炮制好的草珊瑚茎与叶 2 : 1 混合。最优的草珊瑚茎软化切制方法的综合评分的验证值与预测值的偏差为 4.70%。结论 优化的炮制工艺简单、稳定、可行, 所得参数可为草珊瑚的研究生产提供科学依据, 同时 AHP 为中药多指标评价研究提供借鉴。

关键词: 草珊瑚; 层次分析法; 星点设计-效应面法; 多指标评价; 新绿原酸; 绿原酸; 隐绿原酸; 咖啡酸; 异嗪皮啶; 落新妇苷; 迷迭香酸

中图分类号: R283.1

文献标志码: A

文章编号: 0253 - 2670(2019)12 - 2868 - 08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.12.019

Optimization of processing technology of *Sarcandra glabra* based on multi-index evaluation method

WEN Rou, LI Chao, YAN Li-ping, ZHANG Chong-pei, ZHANG Yi-xin, GONG Qian-feng, YU Huan

School of Pharmacy, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

Abstract: Objective Analytic hierarchy process (AHP) was used to establish a comprehensive evaluation method of multiple indexes of traditional Chinese medicine, and the best processing technology of *Sarcandra glabra* was optimized. **Methods** On the basis of single factor experiment, the comprehensive score of neochlorogenic acid, chlorogenic acid, cryptochlorogenic acid, caffeic acid, isofraxidin, astilbin and rosmarinic acid content was used as evaluation index by AHP, and drying temperature and drying time were used as influencing factors. The purification process of *S. glabra* leaves was determined by single factor investigation. Taking soaking time, soaking time, cutting length and drying temperature as influencing factors, the optimal cutting process of *S. glabra* stems was optimized by central composite design-response surface method. Multi-index analytic hierarchy process (AHP) was used to analyze and verify the optimal process. **Results** The best processing technology of *S. glabra* stems was as follows: stem Rob water washed once, soaked in 12 times of water for 1 h, moistened and softened for 3 h, cut into 15 mm segments after taking out, and baked at 50 °C for 2 h; The processing method of leaves was as follows: leaf Rob water washed once and dried at 50 °C for 4 h; Then mixed the processed stems and leaves of *S. glabra* at 2 : 1. The deviation between the verification value and the prediction value of the comprehensive score of the optimal *S. glabra* stem by softening and cutting method was 4.70%. **Conclusion** The processing technology is simple, stable and feasible. The obtained parameters can provide scientific basis for the research and production of *S. glabra*, and AHP can provide reference for the multi-index evaluation of traditional Chinese medicine.

收稿日期: 2019-03-24

基金项目: 国家中药管理局草珊瑚等 10 种中药饮片标准化建设项目 (ZYBZH-Y-JX-27); 基于樟帮特色技术的头刀切制及减毒现代研究 (JXSYLXK-ZHYAO038); 基于特殊调配的临方炮制技术现代研究 (JXSYLXK-ZHYAO043)

作者简介: 温 柔, 在读硕士, 从事中药炮制、饮片质量标准与炮制机制研究。Tel: 18702535428 E-mail: 1240057947@qq.com

*通信作者 龚千锋, 博士生导师, 教授, 从事中药炮制传承、饮片质量标准与炮制机制研究。

Tel: (0791)87118852 E-mail: gongqf2002@163.com

于 欢, 讲师, 中药饮片标准化与中药炮制机理研究。Tel: 18607090626 E-mail: 416931863@qq.com

Key words: *Sarcandra glabra* (Thunb.) Nakai; analytic hierarchy process; central composite design-response surface methodology; multi-index evaluation; neochlorogenic acid; chlorogenic acid; cryptochlorogenic acid; caffeic acid; isofraxidin; astilbin; rosmarinic acid

草珊瑚, 又名肿节风, 系金粟兰科植物草珊瑚 *Sarcandra glabra* (Thunb.) Nakai 的干燥全草, 味苦、辛, 性平, 归心、肝经, 具清热凉血、活血消斑、祛风通络等功效^[1]。现代药理研究表明草珊瑚具有抗菌消炎^[2-3]、保肝^[4]、抗肿瘤等药理作用^[5], 其主要活性成分有黄酮类、苯丙素类、香豆素类等, 总黄酮具有很好的抗肿瘤作用^[6-7], 其中叶中总黄酮的含量最多^[8]。酚酸类成分多具有抗菌消炎、抗病毒、抗血小板凝聚、抗氧化、抗过敏等多种生物活性, 大多具有水溶性^[9-10]。香豆素类主要成分为异嗟皮啶, 是《中国药典》2015年版中作为评价草珊瑚药材及其制剂质量控制指标成分, 已被报道具有一定的抗菌、抗癌作用, 对脂多糖诱导的急性肺损伤有保护作用^[11-13]。目前, 草珊瑚饮片的软化方法、工艺条件仍不统一, 《中国药典》2015年版项下草珊瑚饮片的炮制方法为“除去杂质, 洗净, 润透, 切断, 干燥”, 并无具体炮制参数标准, 饮片质量难以控制。中药切制工艺若仅以单一化学指标性成分的含量高低来评价工艺的优劣, 则会忽略多组分之间的综合效用, 多指标成分含量有助于综合评价草珊瑚切制工艺, 同时, 已有关于草珊瑚多指标有效成分的质量评价研究报道^[13], 草珊瑚有效成分含有量在切制过程中也会有相应变化。因此, 本研究通过单因素试验, 以新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、异嗟皮啶、落新妇苷、迷迭香酸含量的综合评分为评价指标, 采用星点设计-效应面法 (central composite design-response surface methodology, CCD-RSM)^[14-17]对草珊瑚软化切制工艺进行筛选, 由于草珊瑚茎与叶质地相差甚多, 且对热敏感程度不同, 所以草珊瑚茎和叶选择不同处理方式进行工艺优选。并采用多指标层次分析法 (AHP)^[18]结合星点设计-响应面法优化草珊瑚炮制工艺, 本研究将有利于草珊瑚的进一步开发, 有望为制定草珊瑚相关炮制规范及质量标准提供实验依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Waters 2695 型高效液相色谱仪, 包括四元溶剂管理器、柱温箱、二极管阵列 (PDA) 检测器和 Empower 3 色谱工作站, 美国 Waters 公司; AE240 十万分之一电子天平, 美国 Mettler 公司; SQP 型电

子天平, 万分之一, 赛多利斯科学仪器 (北京) 有限公司; YB502N 电子天平, 百分之一, 上海海康电子仪器厂; KQ5200B 型超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司, 功率 200 W, 频率 40 kHz; Milli QB 型超纯水净化系统, 美国 Millipore 公司; GZX-9076MBE 电热鼓风干燥箱, 上海博迅实业有限公司医疗设备厂。

1.2 材料

草珊瑚购自江西省吉安市安福县, 批号 20171025, 经江西中医药大学龚千锋教授鉴定为金粟兰科植物草珊瑚 *Sarcandra glabra* (Thunb.) Nakai 的干燥全草。对照品绿原酸 (批号 110753-201716, 质量分数 $\geq 99.3\%$)、异嗟皮啶 (批号 110837-201608, 质量分数 $\geq 98\%$)、迷迭香酸 (批号 111871-201505, 质量分数 $\geq 98\%$) 购于中国食品药品检定研究院; 对照品新绿原酸 (批号 BCTG-0231, 质量分数 $\geq 98\%$)、隐绿原酸 (批号 BCTG-0210, 质量分数 $\geq 98\%$)、咖啡酸 (批号 BCTG-0286, 质量分数 $\geq 98\%$)、落新妇苷 (批号 BCTG-0233, 质量分数 $\geq 98\%$) 购于中国固体体制制造技术国家工程研究中心。甲酸, LC-MS, 批号 A117-50, Fisher Scientific, 赛默飞世尔科技有限公司; 乙腈, LC-MS, ACS, AC-1026-4000, 美国 ACS 恩科化学; 乙醇, 分析纯, 批号 1705021, 西陇科学股份有限公司; 水为超纯水, 其余为分析纯。

2 方法与结果

2.1 指标成分的 HPLC 测定^[19]

2.1.1 色谱条件 色谱柱 [Diamonsil 5 μm C₁₈ (2), 250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm]; 流动相乙腈-0.1%甲酸水溶液, 梯度洗脱: 0~5 min, 6%~10%乙腈; 5~32 min, 10%~12%乙腈; 32~45 min, 12%~20%乙腈; 45~78 min, 20%~35%乙腈; 78~80 min, 35%~6%乙腈; 体积流量 0.8 mL/min; 柱温 35 $^{\circ}\text{C}$; 检测波长 330 nm (落新妇苷 290 nm)。色谱图见图 1。

2.1.2 供试品溶液制备 精密量取药材粉末 2.0 g (过三号筛), 置于 50 mL 具塞锥形瓶中, 精密加入 30%乙醇 25 mL, 密塞, 称定质量, 超声 (200 W、40 kHz) 30 min, 放冷, 30%乙醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 即得供试品溶液。

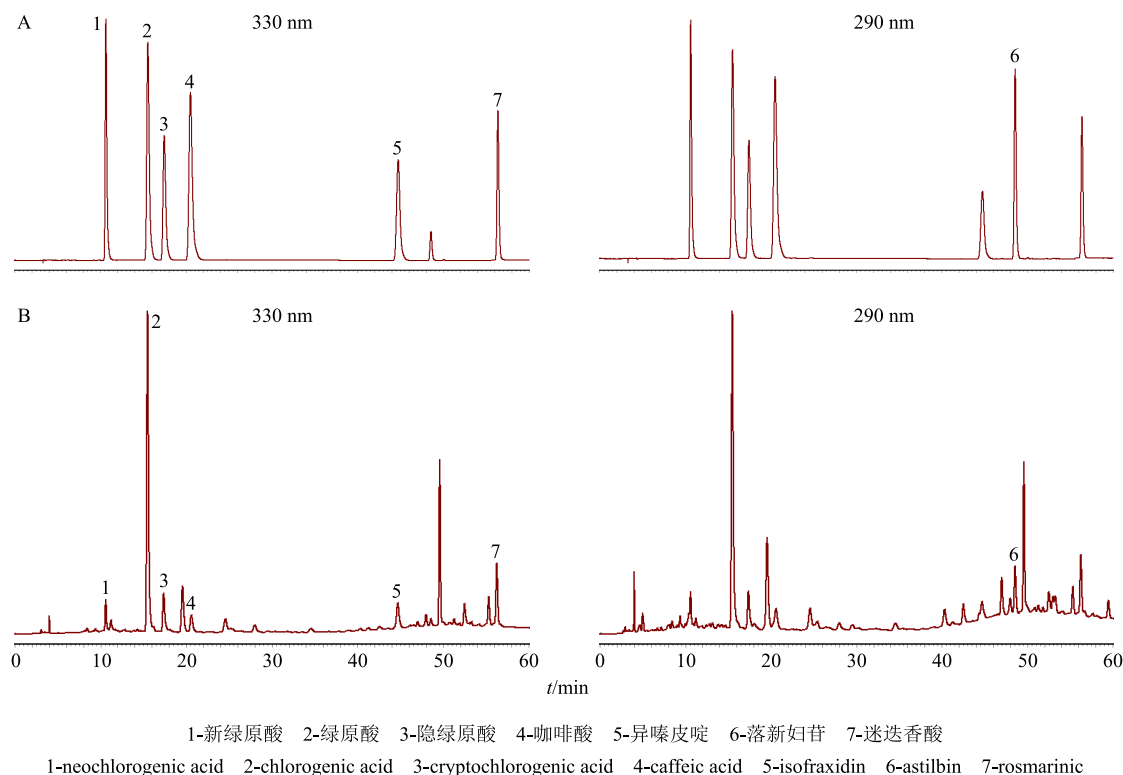


图1 混合对照品 (A) 与草珊瑚茎样品 (B) 溶液的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC diagram of mixed reference substances (A) and *S. glabra* stem samples (B)

2.1.3 对照品溶液制备 精密称取对照品适量, 分别置于 5 mL 量瓶中, 甲醇定容至刻度, 作为储备液, 然后分别吸取适量于 10 mL 量瓶中, 用 30% 甲醇定容至刻度, 摇匀, 配制得质量浓度分别为新绿原酸 74.7 $\mu\text{g/mL}$ 、绿原酸 156.0 $\mu\text{g/mL}$ 、隐绿原酸 59.0 $\mu\text{g/mL}$ 、咖啡酸 51.3 $\mu\text{g/mL}$ 、异嗪皮啶 110.4 $\mu\text{g/mL}$ 、落新妇苷 86.0 $\mu\text{g/mL}$ 、迷迭香酸 75.6 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品溶液。

2.1.4 线性关系考察 分别精密吸取“2.1.3”项对照品溶液适量, 配制成 6 种质量浓度系列的混合对照品溶液, 30% 甲醇定容至刻度, 摇匀, 在“2.1.1”项色谱条件下进样 10 μL 测定。以质量浓度为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y) 进行线性回归, 得回归方程分别为新绿原酸 $Y=26\,500X-3\,180$, $r=0.999\,5$, 线性范围 0.747~37.350 $\mu\text{g/mL}$; 绿原酸 $Y=33\,800X-7\,040$, $r=0.999\,9$, 线性范围 1.560~156.000 $\mu\text{g/mL}$; 隐绿原酸 $Y=43\,700X-2\,820$, $r=0.999\,8$, 线性范围 0.590~29.500 $\mu\text{g/mL}$; 咖啡酸 $Y=61\,200X-11\,400$, $r=0.999\,7$, 线性范围 0.513~25.650 $\mu\text{g/mL}$; 异嗪皮啶 $Y=103\,000X-43\,500$, $r=0.999\,8$, 线性范围 1.104~55.200 $\mu\text{g/mL}$; 落新妇苷 $Y=26\,500X+129$, $r=0.999\,7$, 线性范围 0.860~

43.000 $\mu\text{g/mL}$; 迷迭香酸 $Y=47\,900X-7\,290$, $r=0.999\,8$, 线性范围 0.756~37.800 $\mu\text{g/mL}$; 可知各成分在各自范围内线性关系良好。

2.1.5 精密度试验 精密吸取供试品溶液 10 μL , 按照上述色谱条件连续测定 6 次, 记录峰面积, 测得新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、异嗪皮啶、落新妇苷、迷迭香酸峰面积 RSD 分别为 2.68%、1.01%、1.52%、2.16%、1.59%、0.66%、2.28%, 表明仪器精密度良好。

2.1.6 重复性试验 取同一药材, 按“2.1.2”项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 在“2.1.1”项色谱条件下进样测定, 测得新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、异嗪皮啶、落新妇苷、迷迭香酸含量 RSD 分别为 2.64%、2.50%、2.37%、2.42%、2.81%、2.25%、2.46%, 表明该方法重复性良好。

2.1.7 稳定性试验 取同一供试品溶液, 于 0、2、4、8、12、24 h 在“2.1.1”项色谱条件下进样测定, 测得新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、异嗪皮啶、落新妇苷、迷迭香酸峰面积 RSD 分别为 0.34%、1.05%、0.30%、0.66%、0.88%、0.86%、0.86%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.1.8 加样回收率试验 分别精密称取成分量已知

的药材 2 g, 共 9 份, 随机分为 3 组, 分别精密加入各对照品溶液, 加入量分别为供试品中各成分量的 80%、100%、120%, 在“2.1.1”项色谱条件下进样测定, 计算回收率。结果新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、异嗪皮啶、落新妇苷、迷迭香酸平均加样回收率分别为 94.71%、92.82%、95.11%、100.01%、93.71%、95.30%、95.93%, RSD 分别为 1.12%、2.26%、2.10%、1.60%、2.27%、1.78%、2.18%。表明所建立含量测定方法准确度良好。

2.2 炮制工艺优化方法

草珊瑚叶通过单因素实验, 以干燥温度和干燥时间为关键因素, 选取评分最高的因素水平作为草珊瑚叶最优净制工艺。根据茎和叶的最佳工艺, 将茎和叶以一定比例混合, 通过新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、异嗪皮啶、落新妇苷、迷迭香酸含量 ($Y_1 \sim Y_7$) 的综合评分 (OD), 筛选出草珊瑚的最佳炮制工艺。

2.2.1 草珊瑚叶的工艺优化

(1) 干燥温度的选择: 取草珊瑚叶 5 份, 抢水洗净后分别于 30、40、50、60、70 °C 下烘至水分达标, HPLC 测得以上 7 种成分的含量。对不同干燥温度进行评价, OD 值分别为 3.20、5.32、7.62、4.30、6.25, 结果表明 50 °C 烘干最佳。

(2) 干燥时间的选择: 取草珊瑚叶 5 份, 抢水洗净后分别于 50 °C 烘箱下烘 1、2、3、4、5 h, 1 h 水分还未烘干, 2 h 后 OD 值分别为 5.80、7.30、8.51、8.15, 结果表明烘干 4 h 含量最佳。

草珊瑚叶的炮制包括净制与干燥, 通过 7 个有效成分的综合评价结果, 优选出最佳的草珊瑚叶的炮制方法为 50 °C 烘干 4 h。

2.2.2 草珊瑚茎的单因素实验考察

(1) 浸泡时间的选择: 取草珊瑚茎 5 份, 用 12 倍量水分别浸泡 0、0.5、1.0、1.5、2.0 h, 切 1~2 cm 短段, 50 °C 烘干。HPLC 测得以上 7 种成分的含量, 对不同浸泡时间进行评价, OD 值分别为 5.83、5.99、8.90、8.60、4.22, 选择后续实验优化浸泡时间范围为 0.5~1.5 h。

(2) 闷润时间的选择: 取草珊瑚茎 4 份, 用 12 倍量水分别闷润 1、2、3、4、5、6 h, 切 1~2 cm 短段, 50 °C 烘干。HPLC 测得以上 7 种成分的含量, 对不同闷润时间进行评价, OD 值分别为 7.82、8.90、8.14、7.95、5.65、4.50, 选择后续实验优化闷润时间为 2~4 h。

(3) 切制长度的选择: 《中国药典》2015 年版四部炮制通则规定饮片切段的范围为短段 5~10 mm, 长段 10~15 mm。药典对草珊瑚切段范围没有明确规定为短段或长段, 因此本实验选择 5 mm、10~20 mm、30 mm 3 个规格进行考察, 取草珊瑚茎适量, 抢水洗净杂质, 用 12 倍量水闷润 2 h, 分别切制为约 5 mm、10~20 mm、30 mm 的段, 50 °C 干燥至水分达标。考察不同切制规格对以上 7 种成分的影响, OD 值分别为 7.85、9.35、8.69。选择后续实验优化切制长度为 10~20 mm。

(4) 干燥温度的选择: 取草珊瑚茎 5 份, 用 12 倍量水闷润 2 h, 切 1.0 cm 短段, 分别在 30、40、50、60、70 °C 的温度下烘干。HPLC 测得以上 7 种成分的含量, 对不同干燥温度进行评价, OD 值分别为 6.99、9.71、7.86、7.77、7.39。选择后续实验优化干燥温度为 40~60 °C。

2.2.3 草珊瑚茎切制设计方案 草珊瑚植株蓬松, 易掉叶, 茎和叶质地不同, 因此茎和叶的软化工艺参数也不一样。草珊瑚茎试验采用中心组合设计, 在单因素考察的基础上, 选取对切制过程中影响较显著的 4 个因素: 浸泡时间 (A)、闷润时间 (B)、切制长度 (C)、干燥温度 (D) 作为自变量, 以有效成分新绿原酸 (Y_1)、绿原酸 (Y_2)、隐绿原酸 (Y_3)、咖啡酸 (Y_4)、异嗪皮啶 (Y_5)、落新妇苷 (Y_6)、迷迭香酸 (Y_7) 含量为指标。根据设计方案草珊瑚茎进行 4 因素 3 水平试验, 每个因素选取低、中、高 3 水平, 分别记作 -1、0、+1。结合 AHP 法, 以有效成分增量最大为最优目的, 预测草珊瑚茎最优切制工艺。星点设计因素水平表见表 1, 采用 Design Expert DX8.2 软件根据此因素水平形成设计方案及定量测定结果, 见表 1。

2.2.4 AHP 模型建立 草珊瑚炮制工艺评价这个决策目标可由 7 个指标性成分 (次级目标) 来反映, 建立层次结构模型, 基于异嗪皮啶和迷迭香酸作为草珊瑚质量控制的指标性成分, 绿原酸含量较大, 落新妇苷为黄酮类成分代表, 咖啡酸含量最少, 将这 7 项指标分为 5 个层次, 确定指标的重要性, 异嗪皮啶 = 迷迭香酸 > 绿原酸 > 落新妇苷 > 新绿原酸 = 隐绿原酸 > 咖啡酸, 以 YAAHP 12.1 层次分析软件设计并比较两两之间重要性, 评分标准见表 2。并构建各成分的优先判断矩阵, 见表 3, 且获得各成分的相对评分。根据表 3 评分结果, 以 YAAHP 12.1 层次分析软件计算得到各有效成分权重系数。

表 1 草珊瑚茎切制工艺优化的星点设计方案及结果

Table 1 Central composite design and results of cutting process optimization

试验号	A/h	B/h	C/mm	D/°C	$Y_1/(\text{mg}\cdot\text{g}^{-1})$	$Y_2/(\text{mg}\cdot\text{g}^{-1})$	$Y_3/(\text{mg}\cdot\text{g}^{-1})$	$Y_4/(\text{mg}\cdot\text{g}^{-1})$	$Y_5/(\text{mg}\cdot\text{g}^{-1})$	$Y_6/(\text{mg}\cdot\text{g}^{-1})$	$Y_7/(\text{mg}\cdot\text{g}^{-1})$	OD 值
1	1.0 (0)	3 (0)	15 (0)	50 (0)	0.200 2	1.808 4	0.314 6	0.089 3	0.256 3	0.221 0	0.291 5	9.72
2	1.0 (0)	3 (0)	15 (0)	50 (0)	0.187 7	1.820 3	0.279 6	0.085 7	0.245 5	0.206 2	0.283 4	9.35
3	1.0 (0)	3 (0)	15 (0)	50 (0)	0.201 6	1.836 7	0.300 5	0.094 6	0.248 3	0.222 5	0.298 7	9.73
4	1.0 (0)	3 (0)	15 (0)	50 (0)	0.197 9	1.805 5	0.296 6	0.088 2	0.244 8	0.212 2	0.296 1	9.55
5	1.0 (0)	3 (0)	15 (0)	50 (0)	0.200 8	1.847 3	0.295 3	0.087 8	0.246 9	0.217 8	0.297 4	9.65
6	1.0 (0)	3 (0)	15 (0)	50 (0)	0.195 4	1.758 0	0.294 9	0.088 5	0.236 2	0.207 5	0.284 9	9.28
7	0.5 (-1)	2 (-1)	20 (+1)	60 (+1)	0.076 4	1.035 4	0.019 9	0.039 8	0.146 5	0.171 0	0.201 6	5.56
8	1.5 (+1)	4 (+1)	20 (+1)	40 (-1)	0.122 8	1.552 6	0.215 9	0.046 0	0.188 9	0.261 1	0.195 8	7.40
9	1.5 (+1)	2 (-1)	10 (-1)	40 (-1)	0.037 2	0.670 1	0.092 7	0.028 1	0.061 6	0.130 0	0.181 3	3.93
10	1.0 (0)	3 (0)	15 (0)	30 (-2)	0.068 4	1.203 7	0.143 8	0.051 1	0.082 9	0.178 9	0.152 7	4.90
11	1.5 (+1)	2 (-1)	20 (+1)	40 (-1)	0.105 8	0.881 2	0.183 1	0.058 2	0.075 1	0.133 3	0.181 2	4.82
12	1.5 (+1)	4 (+1)	20 (+1)	60 (+1)	0.083 5	0.985 6	0.151 8	0.045 9	0.051 6	0.226 5	0.184 6	4.89
13	0.5 (-1)	2 (-1)	10 (-1)	40 (-1)	0.069 2	1.001 6	0.127 9	0.047 9	0.094 9	0.158 0	0.159 3	4.77
14	1.0 (0)	1 (-2)	15 (0)	50 (0)	0.022 7	0.358 6	0.044 0	0.046 6	0.020 6	0.073 2	0.055 6	1.74
15	0.5 (-1)	4 (+1)	10 (-1)	60 (+1)	0.056 0	0.769 0	0.116 8	0.034 2	0.051 8	0.165 6	0.163 3	4.03
16	0.5 (-1)	4 (+1)	20 (+1)	60 (+1)	0.053 2	0.952 9	0.114 1	0.043 7	0.095 0	0.187 9	0.115 8	4.35
17	1.0 (0)	3 (0)	15 (0)	50 (0)	0.032 3	0.734 3	0.074 6	0.030 1	0.050 4	0.124 2	0.143 9	3.45
18	1.0 (0)	3 (0)	25 (+2)	50 (0)	0.039 3	0.942 2	0.104 5	0.028 9	0.081 3	0.154 4	0.191 3	4.62
19	0.5 (-1)	2 (-1)	10 (-1)	60 (+1)	0.055 7	0.698 5	0.112 2	0.045 0	0.098 9	0.091 0	0.189 1	4.44
20	0.5 (-1)	4 (+1)	10 (-1)	40 (-1)	0.069 8	1.197 1	0.153 9	0.035 1	0.083 6	0.238 5	0.159 6	5.16
21	1.5 (+1)	2 (-1)	20 (+1)	60 (+1)	0.049 8	0.806 6	0.110 6	0.025 4	0.053 9	0.125 7	0.148 1	3.71
22	0.5 (-1)	2 (-1)	20 (+1)	40 (-1)	0.091 8	1.078 4	0.180 4	0.033 4	0.109 6	0.146 1	0.184 0	5.30
23	0.5 (-1)	4 (+1)	20 (+1)	40 (-1)	0.093 0	1.813 3	0.164 6	0.048 4	0.095 8	0.191 2	0.158 7	5.82
24	1.5 (+1)	4 (+1)	10 (-1)	60 (+1)	0.046 0	0.927 7	0.086 5	0.051 5	0.057 7	0.134 6	0.119 0	3.69
25	1.0 (0)	3 (0)	5 (-2)	50 (0)	0.043 6	0.747 0	0.095 8	0.048 0	0.052 9	0.173 0	0.183 4	4.22
26	1.0 (0)	3 (0)	15 (0)	70 (+2)	0.044 0	0.603 8	0.096 5	0.044 1	0.052 3	0.120 9	0.112 7	3.19
27	1.5 (+1)	4 (+1)	10 (-1)	40 (-1)	0.136 1	0.990 6	0.232 2	0.063 8	0.153 1	0.111 5	0.221 7	6.27
28	1.0 (0)	5 (+2)	15 (0)	50 (0)	0.036 3	0.343 1	0.056 1	0.078 3	0.026 7	0.069 5	0.087 8	2.28
29	0 (-2)	3 (0)	15 (0)	50 (0)	0.087 9	1.352 2	0.153 5	0.063 1	0.080 4	0.177 9	0.104 5	4.69
30	2 (+2)	3 (0)	15 (0)	50 (0)	0.081 5	0.925 6	0.153 0	0.051 1	0.066 1	0.170 8	0.224 3	5.15

表 2 各层次评分标准

Table 2 Grading standards at all levels

相对评分	重要性定义
9	绝对重要/有优势
7	十分重要/有优势
5	比较重要/有优势
3	稍微重要/有优势
1	同等重要
2, 4, 6, 8	两相邻重要程度的中间评分
倒数	若甲相对于乙的重要性为 a , 则乙相对于甲的重要性为 $1/a$

当 CR (随机一致性比率, 作为衡量所得权重系数是否合理的指标, $\text{CR}=\text{CI}/\text{RI}) < 0.1$ 时, 判断矩阵符合一致性检验, 表明权重系数合理有效, 它可用在草珊瑚炮制工艺优选的综合评分中。

2.2.5 综合评分方法 以 OD 值为评价指标, 总分为 10 分, $\text{OD}=(0.065\ 4\ Y_1/Y_{1\max}+0.171\ 7\ Y_2/Y_{2\max}+0.065\ 4\ Y_3/Y_{3\max}+0.041\ 3\ Y_4/Y_{4\max}+0.274\ 5\ Y_5/Y_{5\max}+0.107\ 2\ Y_6/Y_{6\max}+0.274\ 5\ Y_7/Y_{7\max})\times 10$, $Y_{1\max}$ 、 $Y_{2\max}$ 、 $Y_{3\max}$ 、 $Y_{4\max}$ 、 $Y_{5\max}$ 、 $Y_{6\max}$ 、 $Y_{7\max}$ 分别为各成分对应的最大测定值^[20-21]。

2.2.6 CCD-RSM 优选草珊瑚茎切制工艺

表 3 7 项指标成分成对比较优先判断矩阵及权重系数

Table 3 Comparison of priority judgment matrix and weight coefficient of seven indicator components pairwise

目标	异嗪皮啶	迷迭香酸	绿原酸	落新妇苷	新绿原酸	隐绿原酸	咖啡酸	权重系数 (W_i)	$\lambda_{\max}$	CR
异嗪皮啶	1	1	2	3	4	4	5	0.274 5	7.088 6	0.011 2
迷迭香酸	1	1	2	3	4	4	5	0.274 5		
绿原酸	1/2	1/2	1	2	3	3	4	0.171 7		
落新妇苷	1/3	1/3	1/2	1	2	2	3	0.107 2		
新绿原酸	1/4	1/4	1/3	1/2	1	1	2	0.065 4		
隐绿原酸	1/4	1/4	1/3	1/2	1	1	2	0.065 4		
咖啡酸	1/5	1/5	1/4	1/3	1/2	1/2	1	0.041 3		

(1) 模型拟合与显著性检验: 模型拟合分析见表 4。试验数据运用 Design-Expert 8.0.6 软件进行响应面分析, 以各 OD 值 (Y) 对各因素进行多元线性回归和 2 项式拟合, 得回归方程 $Y=0.95+3.384 \times 10^{-3} A+0.023 B+0.014 C-0.048 D+0.037 AB-1.850 \times 10^{-3} AC-0.018 AD+0.010 BC-0.045 BD-9.199 \times 10^{-3} CD-0.095 A^2-0.17 B^2-0.12 C^2-0.12$

D^2 , $r^2=0.927 2$, 对模型采用 F 检验进行方差分析, 结果见表 5。结果显示各因素对新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、异嗪皮啶、落新妇苷和迷迭香酸含量的影响顺序为 $D>B>C>A$, 二项式模型 $P<0.01$, 失拟项显著 ($P<0.05$), 达到极显著水平, 表明该实验模型拟合良好, 具有统计学意义, 实验误差小, 说明该方程与实际情况拟合度良好, 且相

表 4 多种模型拟合分析

Table 4 Sequential model sum of squares for D -optima

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	备注
平均模型 vs 总差	914.68	1	914.68			
线性模型 vs 平均模型	7.38	4	1.84	0.31	0.867 7	
双因素 vs 线性	6.22	6	1.04	0.14	0.989 2	
2 次方程 vs 双因素	130.63	4	32.66	43.28	<0.000 1	建议
3 次方程 vs 2 次方程	2.71	8	0.34	0.27	0.954 7	
残差	8.61	7	1.23			
总计	1 070.22	30	35.67			

表 5 回归模型方差分析

Table 5 ANOVA for regression model

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	144.23	14	10.30	<0.000 1	CD	0.14	1	0.14	0.677 9
A	0.027	1	0.027	0.851 2	A^2	24.95	1	24.95	<0.000 1
B	1.28	1	1.28	0.212 7	B^2	77.62	1	77.62	<0.000 1
C	0.49	1	0.49	0.434 5	C^2	41.19	1	41.19	<0.000 1
D	5.59	1	5.59	0.015 8	D^2	37.72	1	37.72	<0.000 1
AB	2.15	1	2.15	0.112 0	残差	11.32	15	0.75	
AC	5.477×10^{-3}	1	5.477×10^{-3}	0.933 2	失拟项	11.13	10	1.11	0.000 8
AD	0.50	1	0.50	0.426 7	纯误差	0.18	5	0.037	
BC	0.17	1	0.17	0.639 8	总差	155.55	29		
BD	3.25	1	3.25	0.055 5					

$P<0.05$ 为显著性差异; $P<0.01$ 为极显著性差异

$P<0.05$ significant difference; $P<0.01$ great significant difference

对于多元线性拟合的相关系数有提高,表明该方程有较大的可信度,预测性较好,可利用该模型分析草珊瑚茎切制的工艺条件。

(2) 工艺优化与预测: 根据星点试验结果应用 Design-Expert V8.0.6 软件绘制 OD 的三维效应面

图,见图 2。对 2 项式回归模型进行预测分析,得最优切制工艺为 0.06、0.11、0.07、-0.23,结合实际操作的可性,得草珊瑚茎最优切制工艺为浸泡时间 1 h,闷润时间 3 h,切制长度 15 mm,干燥温度 50 °C。

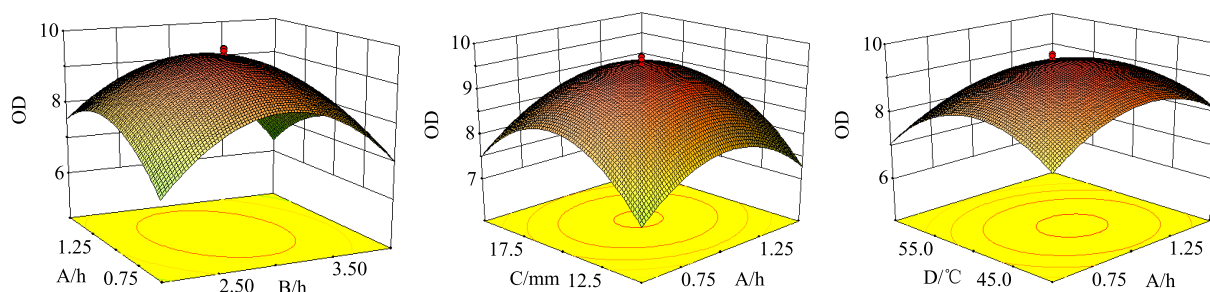


图 2 浸泡时间 (A)、闷润时间 (B)、切制长度 (C) 和干燥温度 (D) 的交互作用响应面图

Fig. 2 Interaction response flour diagram of soaking time (A), soaking time (B), cutting length (C) and drying temperature (D)

2.2.7 验证试验 为验证该工艺的准确度,取 3 份草珊瑚药材,照上述已确定的最佳切制工艺条件炮制,分别测定每份饮片中绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、异嗪皮啉、落新妇苷、迷迭香酸的含量,最终综合评分 OD 平均值为 9.17,与 OD 预测值 (9.62) 的偏差分别为 4.70% < 5%。RSD 为 2.50%,其稳定可行,说明该拟合值与实际试验点拟合较好,模型方程可靠实用。

2.3 草珊瑚炮制工艺优选

将验证后的草珊瑚茎饮片,与优选的草珊瑚叶饮片按茎-叶 (2:1、4:1) 混合, HPLC 测得 7 个有效成分的含量,按 OD 值按综合评分高低为 2:1 > 4:1,根据草珊瑚原药材茎与叶的质量比约为 2:1,结合实际应用,优选出草珊瑚炮制工艺为将草珊瑚茎与叶分开,抢水洗净 1 次,茎 12 倍量水浸泡 1 h,闷润 3 h, 50 °C 烘干 2 h; 叶 50 °C 烘干 4 h,再将茎与叶按 2:1 混合即可。

3 讨论

3.1 炮制工艺参数优选

由于全草类药材传统切制工艺缺乏可行的工艺参数标准,故本实验对原药材采用浸泡法、闷润法、浸润法进行了考察,通过 OD 值评分优选出浸润法软化草珊瑚茎;分别以 10、12、15、20 倍量水对药材用水量进行了考察,通过 OD 值与表面现象发现 12 倍量水可达到药透汤尽,且 OD 值最高;为使工艺考察可行性强,单因素试验还考察了干燥时间,表明干燥 2 h 水分合格且评分最高。综合考察,为节省水资源和充分软化药材,保证药材质量,防止

有效成分流失和化学成分改变,浸润软化茎的加水量确定为 12 倍量,干燥 2 h。

3.2 分析方法选择与样品提取方法、色谱条件考察

本实验采用响应面优化法,对多个有效分析指标进行综合评分得到响应值,通过非线性数学模型拟合,得到一个明确的函数式来表达各因素和 OD 值之间的关系,进而找到考察因素的最佳方法。利用层次分析法对分析指标得到权重系数进行综合评分, AHP 法是在专家的主观判断基础上做了进一步数学处理,通过主观与客观的结合,使结果更加科学化,验证切制工艺的合理性。

同时考察了甲醇、60%甲醇、30%乙醇溶剂超声、回流提取,最终选取了效益高、毒性小、时间短的 30%乙醇溶剂超声提取,采用乙腈-0.1%甲酸水溶液梯度洗脱,双波长同时测定新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、异嗪皮啉、迷迭香酸在 330 nm 处均有较好吸收,落新妇苷最大吸收在 290 nm 处,故选择 290 nm 检测落新妇苷,330 nm 检测其他 6 种成分,综合评价草珊瑚炮制工艺。

3.3 小结与展望

全草类中药材目前普遍存在一些问题,比如产地加工简单、炮制工艺繁琐、质量水平不齐,传统中药炮制技术是中国的瑰宝,是中医在长期的辨证论治用药实践中总结形成的经验积累,传承中药炮制技术的同时也应发展中药炮制技术,现在已有大部分中药饮片生产企业联合建立了中药材种植基地,将药材采收或收购后,可进行产地趁鲜加工,不需大批运到饮片厂再次加工,减少药材有效成分

流失,进而影响饮片质量。规范草珊瑚饮片生产,以传统炮制为基础,可考虑趁鲜加工方法,提高中药饮片质量,确保疗效。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] Tsai Y C, Chen S H, Lin L C, *et al.* Anti-inflammatory principles from *Sarcandra glabra* [J]. *J Agr Food Chem*, 2017, 65(31): 6497-6505.
- [3] Wang M, Zhao J, Zhao Y, *et al.* A new coumarin isolated from *Sarcandra glabra* as potential anti-inflammatory agent [J]. *Nat Prod Res*, 2016, 30(16): 1796-1801.
- [4] Psotova J, Svobodova A, Kolarova H, *et al.* Photoprotective properties of *Prunella vulgaris* and rosmarinic acid on human keratinocytes [J]. *J Photoch Photobio B*, 2006, 84(3): 167-174.
- [5] Guo X, Shen L, Tong Y H, *et al.* Antitumor activity of caffeic acid 3,4-dihydroxyphenethyl ester and its pharmacokinetic and metabolic properties [J]. *Phytomedicine*, 2013, 20(10): 904-912.
- [6] 章武强, 苏敏, 陈奇. 肿节风总黄酮对环磷酰胺抗小鼠肉瘤 S180 的增效减毒作用 [J]. 中国医药导报, 2011, 8(31): 17-19.
- [7] 卢晓南, 张洁, 彭文虎, 等. 肿节风总黄酮对阿糖胞苷所致血小板减少动物模型骨髓基质细胞和巨核细胞的影响 [J]. 中药药理与临床, 2018, 34(1): 32-35.
- [8] 励娜, 杨荣平, 王宾豪, 等. 紫外分光光度法测定肿节风不同部位总黄酮的含量 [J]. 重庆中草药研究, 2011, 63(1): 47.
- [9] Chu X, Ci X, He J, *et al.* Effects of a natural prolyl oligopeptidase inhibitor, rosmarinic acid, on lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice [J]. *Molecules*, 2012, 17(3): 3586-3598.
- [10] 胡晓茹, 许旭东, 杨俊山. 草珊瑚的研究概况 [J]. 中国药学杂志, 2008, 43(10): 721-723.
- [11] 应国清, 陆红娅, 王鸿, 等. 中药肿节风的研究进展 [J]. 上海中医药杂志, 2007, 41(6): 85-87.
- [12] Niu X, Wang Y, Li W, *et al.* Protective effects of isofraxidin against lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice [J]. *Int Immunopharmacol*, 2015, 24(2): 432-439.
- [13] Yamazaki T, Tokiwa T. Isofraxidin, a coumarin component from *Acanthopanax senticosus*, inhibits matrix metalloproteinase-7 expression and cell invasion of human hepatoma cells [J]. *Biol Pharm Bull*, 2010, 33(10): 1716-1722.
- [14] 马闪闪, 张志锋, 吕露阳, 等. 白花丹醌传递体凝胶的制备及其体外透皮研究 [J]. 中草药, 2018, 49(15): 3625-3631.
- [15] 吕维, 吴恋, 罗红丽, 等. 星点设计-效应面法优化川芎提取工艺 [J]. 药物评价研究, 2014, 37(1): 53-57.
- [16] 冯松浩, 金云隆, 白明学, 等. 基于星点设计-效应面法优化元胡止痛口腔崩解片处方的研究 [J]. 中草药, 2018, 49(23): 5568-5572.
- [17] 王博, 李洪起, 连潇嫣, 等. 星点设计-效应面法优化阿德福韦-β-环糊精包合物制备工艺的研究 [J]. 现代药物与临床, 2014, 29(11): 1227-1230.
- [18] 张琳, 周欣, 闫丹, 等. 基于 CRITIC-AHP 权重分析法结合 Box-Behnken 设计-响应面法优选陈皮饮片炮制工艺 [J]. 中草药, 2018, 49(16): 3829-3834.
- [19] 潘馨, 袁林清, 周楚楚, 等. HPLC 同时测定草珊瑚中 9 个有效成分的含量 [J]. 药物分析杂志, 2017, 37(7): 1207-1214.
- [20] 任爱农, 卢爱玲, 田耀洲, 等. 层次分析法用于中药复方提取工艺的多指标权重研究 [J]. 中国中药杂志, 2008, 33(4): 372-374.
- [21] 赵永峰, 陈志敏, 权亮, 等. 多指标层次分析法结合 D-最优设计响应面法优化黄丝郁金酒炙工艺 [J]. 亚太传统医药, 2018, 14(5): 67-70.