

## 基于正交试验设计-熵权逼近理想解排序法 (TOPSIS) 优选巴戟天酒炙工艺及炮制前后药效对比研究

刘梦云, 秦祎苒, 刘秋怡, 丁平\*

广州中医药大学中药学院, 广东 广州 510006

**摘要:**目的 优选巴戟天酒炙工艺, 并比较炮制前后对环磷酰胺所致生精障碍雄性小鼠生殖氧化应激的影响。方法 采用  $L_{16}(4^5)$  正交试验设计, 以蔗糖、1-蔗糖、耐斯糖、1F-果呋喃糖基耐斯糖 4 种寡糖总含量为评价指标, 结合方差分析和熵权逼近理想解排序法 (technique for order of preference by similarity to ideal solution, TOPSIS) 筛选酒炙巴戟天的工艺参数, 并比较巴戟天酒炙前后对环磷酰胺所致生精障碍雄性小鼠生殖氧化应激的影响。结果 酒炙巴戟天最佳炮制工艺参数: 100 g 饮片加黄酒 20 mL, 密闭闷润 2 h, 炒制温度 60 °C, 炒制时间 7 min, 于 50 °C 干燥 1 h。药效实验结果表明, 巴戟天酒炙后总寡糖对模型小鼠生殖氧化应激作用明显优于生品总寡糖 ( $P < 0.05$ )。结论 首次运用熵权 TOPSIS 法优选巴戟天酒炙工艺, 结果简便、准确、可行; 药效实验结果为巴戟天酒炙的合理性提供科学依据。

**关键词:** 酒炙巴戟天; 炮制工艺; 寡糖; 正交试验; 熵权 TOPSIS 法; 生殖氧化应激

中图分类号: R283.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)20-6208-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.20.010

## Process optimization of stir-frying with yellow wine for *Morindae Officinalis Radix* based on orthogonal test-entropy weight TOPSIS method and comparison of efficacy before and after processing

LIU Meng-yun, QIN Yi-ran, LIU Qiu-yi, DING Ping

School of Pharmaceutical Sciences, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China

**Abstract: Objective** To optimize the processing technology of stir-frying with yellow wine for Bajitian (*Morindae Officinalis Radix*, MOR) and compare the effects of MOR on the reproductive oxidative stress of male mice with spermatogenesis induced by cyclophosphamide before and after processing. **Methods** Using the orthogonal test  $L_{16}(4^5)$ , variance and entropy weight Technique for Order of Preference by Similarity to Ideal Solution (TOPSIS) methods were used to screen technological parameters of processing with the content of sucrose, 1-kestose, nystose, 1F-fructofuranosyl nystose as evaluation index. And of the efficacy of MOR before and after processing on reproductive oxidative stress of male mice with spermatogenesis induced by cyclophosphamide was compared. **Results** The best processing parameters were 100 g decoction pieces and 20 mL yellow wine for moistening for 2 h, stir-frying temperature was 60 °C, stir-frying time was 7 min, drying at 50 °C for 1 h. The results of pharmacodynamic experiments showed that MOR oligosaccharides after stir-frying with yellow wine had significantly better effects than the raw MOR oligosaccharides on the reproductive oxidative stress of model mice ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** In this experiment, the entropy weight TOPSIS method was first used to optimize the process parameters of stir-frying with yellow wine for MOR, which was simple, accurate and feasible. And the results of pharmacodynamic experiments could provide a scientific basis for the rationality of processed MOR.

**Key words:** *Morindae Officinalis Radix* stir-frying with wine; processing technology; oligosaccharides; orthogonal test; entropy weight TOPSIS methods; reproductive oxidative stress

巴戟天为茜草科植物巴戟天 *Morinda officinalis* 布于广东、广西、海南等地区。具有补肾阳、强筋骨、祛风湿的作用, 是我国传统补肾阳中药之一, How 的干燥根, 是我国“四大南药”之一, 主要分

收稿日期: 2021-05-12

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (82074007); 广东省农业科技创新及推广体系建设项目 (2019KJ142)

作者简介: 刘梦云 (1992—), 女, 博士研究生, 主要从事中药质量评价与中药资源研究。E-mail: liumengyun218@163.com

\*通信作者: 丁平, 博士, 研究员, 主要从事中药资源与中药质量评价研究。Tel: (020)39358080 E-mail: dingpinggz@126.com

临床用于阳痿遗精、宫冷不孕、风湿痹痛、筋骨痿软等症<sup>[1]</sup>。现代科学研究表明巴戟天主要含蒽醌、环烯醚萜、寡糖及多糖等化合物,具有抗抑郁、抗炎、抗骨质疏松、增强免疫力、改善生殖等药理活性<sup>[2-8]</sup>。巴戟天含糖量大,生品总糖可达50%以上,且多集中于皮部<sup>[9]</sup>,其中,寡糖已被证明具有抗抑郁、促进小鼠精子生长、提高免疫等作用<sup>[2-5]</sup>。

巴戟天 *Morindae Officinalis Radix* (MOR) 始载于《神农本草经》中被列为上品,历代本草均有记载。唐代《银海精微》中最早见有“酒浸一宿,去皮心”的记载<sup>[10]</sup>;《雷公炮炙论》也记载了“凡使须用枸杞子汤浸一宿,待稍软漉出,却用酒浸一伏时,又漉出…”<sup>[11]</sup>,开始将酒制等方法引入巴戟天的炮制中;明清时期酒制(如酒浸、酒焙等)的应用尤为突出。现今,虽然1990年版至2020年版《中国药典》主要收录了巴戟天、巴戟肉、盐巴戟天和制巴戟天4个品种,未收录酒巴戟天。但在中国部分地区仍有应用酒巴戟天,且已收录于地方中药材炮制规范中,如《广东省中药饮片炮制规范》(第一册)。传统的酒炙法是加入黄酒闷润一段时间后在锅中炒干,炒制的火力和时间等全凭操作工的炮制经验而定,具体炮制工艺参数难以量化<sup>[12]</sup>。酒能行能散,可以通经活络,药物经过酒炙后能缓和其寒性、引导药物直达病所;而且酒炙后的药材入汤剂,其有效成分易于煎出。据文献报道,炮制方法不同,巴戟天中寡糖类成分含量也有所不同,其中,生巴戟天中寡糖含量与炮制品相比较少<sup>[13]</sup>。而巴戟天是否需要酒炙?酒炙后寡糖类成分含量是否增加、能否增强巴戟天“温肾助阳”的作用?国内外尚未见研究报告。本实验首次采用正交试验设计,以蔗糖、1-蔗糖三糖、耐斯糖、1F-果呋喃糖基耐斯糖4种寡糖成分的总含量为评价指标,结合熵权法逼近理想解排序法(technique for order of preference by similarity to ideal solution, TOPSIS)筛选酒炙巴戟天的工艺参数,并比较其酒炙前后对环磷酰胺所致生精障碍的雄性小鼠生殖氧化应激的影响,为巴戟天酒炙提供理论依据。

## 1 材料

### 1.1 药品与试剂

巴戟天药材来源于广东德庆县高良镇巴戟天种植基地,经广州中医药大学的丁平研究员鉴定为茜草科巴戟天属植物巴戟天 *M. officinalis* How 的干燥根。对照品蔗糖(批号为S02S6G1)、1-蔗糖三糖(批

号为AWG0714)、耐斯糖(批号为Z17A9H59088)、1F-果呋喃糖基耐斯糖(批号为S09A8D41431)均购于上海源叶生物科技有限公司,质量分数均为98%。乙腈,色谱纯,美国ACS化学试剂公司;三乙胺,色谱纯,天津科密欧化学试剂有限公司;乙醇,分析纯,天津大茂化学试剂有限公司;黄酒,批号为20190815,绍兴市乾升酒业有限责任公司;水为去离子水、生理盐水,石家庄四药有限公司;伊红染料,阿拉丁试剂(上海)有限公司;注射用环磷酰胺,德国Baxter Oncology GmbH公司,批号9F312A;维生素E,批号S12201001210,浙江医药股份有限公司新昌制药厂;谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)试剂盒(批号为20191209)、丙二醛试剂盒(批号为20191218)、过氧化氢酶(catalase, CAT)试剂盒(可见光法)(批号为20191214)均购于南京建成生物工程研究所;一次性无菌注射器,岳阳明康医用材料有限公司;冻存管,南通云程实验器材有限公司;托盘,组织剪,眼科剪,镊子等。

### 1.2 实验动物

SPF级KM雄性小鼠,体质量(20±2)g。广州中医药大学实验动物中心,许可证号:SYXK(粤)2018-0085。所有动物实验遵循广州中医药大学有关实验动物管理和使用的规定,均符合3R原则。

### 1.3 仪器

Hitachi Primaide 高效液相色谱仪,包括1110泵,1210自动进样器,1310柱温箱,日本日立高新技术公司;UM5800 蒸发光散射检测器,上海通微分析技术有限公司;XR 205 SM-DR 电子分析天平,精度=0.01 mg,瑞士Precisa公司;电子分析天平,精度=0.1 mg,瑞士Sartorius公司;DFT-200 高速万能粉碎机,25 000 r/min,温岭市林大机械有限公司;CQ-200 超声波清洗器,功率200 W,频率40 kHz,上海音波声电科技公司;Eclipse TE2000-5 倒置荧光显微镜,日本尼康公司;BC-2800Vet 全自动动物血液细胞分析仪,深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司;CT14RD 低速冷冻离心机,天美(中国)科学仪器有限公司;1510 全波长酶标仪,Thermo Fisher Scientific公司;Eppendorf(德国)移液枪等。

## 2 方法与结果

### 2.1 巴戟天酒炙工艺

取100 g生巴戟天药材,加定量黄酒拌匀,闷润一定的时间,置炒制容器中炒制一定的时间,取

出, 烘干。取已炮制好的酒巴戟天, 除杂, 用高速打粉机粉碎, 过 50 目筛, 备用。

## 2.2 4 种指标成分含量测定

**2.2.1 对照品溶液的制备** 分别取蔗糖、1-蔗果三糖、耐斯糖、1F-果呋喃糖基耐斯糖对照品适量, 精密称定, 加入 60% 乙醇超声溶解, 即得混合对照品储备溶液, 最终质量浓度分别为蔗糖 1.220 mg/mL、1-蔗果三糖 0.610 mg/mL、耐斯糖 1.508 mg/mL、1F-果呋喃糖基耐斯糖 1.599 mg/mL。

**2.2.2 供试品溶液的制备** 取巴戟天生品及每个正交试验设计组汤炙巴戟天样品 0.5 g, 平行 3 份, 精密称定质量, 置于 100 mL 具塞锥形瓶中, 精密加入 50 mL 50% 乙醇, 称定质量, 静置 30 min 后, 再超声提取 20 min, 用 50% 乙醇补足缺失的质量, 摇匀, 静置 10 min, 过 0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜, 取续滤液, 即得。

**2.2.3 色谱条件** 色谱柱为 Waters XBridge™ Amide 柱 (250 mm  $\times$  4.6 mm, 3.5  $\mu\text{m}$ ); 流动相为 0.2% 三乙胺乙腈溶液 (A)-0.2% 三乙胺水溶液 (B), 梯度洗脱程序: 0~10 min, 75%~70% A; 10~20 min, 70% A; 20~45 min, 70%~60% A; 45~60 min, 60% A; 60~63 min, 60%~75% A; 63~75 min, 75% A; 体积流量 0.8 mL/min; 进样量 20  $\mu\text{L}$ ; 蒸发光散射检测器 (ELSD) 漂移管温度 75  $^{\circ}\text{C}$ ; 氮气流量 2.0 L/min; 柱温 35  $^{\circ}\text{C}$ 。混合对照品、生巴戟天药材和酒巴戟天药材的 HPLC-ELSD 图见图 1。

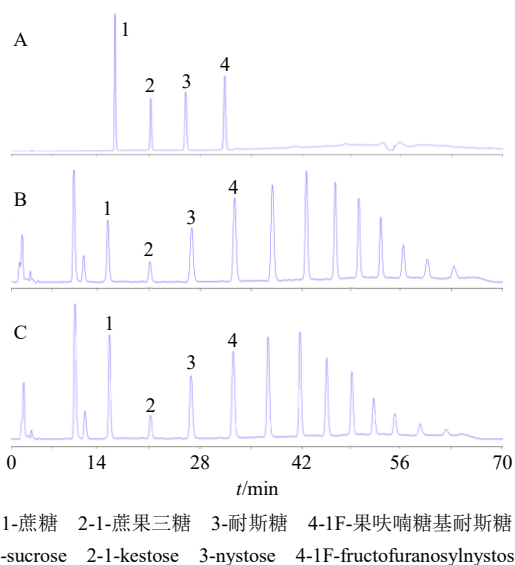


图 1 混合对照品 (A)、生巴戟天药材 (B) 和酒巴戟天药材 (C) 的 HPLC-ELSD 图

Fig. 1 HPLC-ELSD of mixed reference substances (A), MOR samples of raw (B) and stir-frying with yellow wine (C)

**2.2.4 线性关系考察** 分别精密吸取混合对照品储备液 0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL, 加 50% 乙醇定容至 5 mL, 配制成一系列不同质量浓度的对照品溶液, 按照“2.2.1”项色谱条件进样测定, 以各对照品峰面积 (A) 积分值的对数值 (Y) 对各进样质量 ( $\mu\text{g}$ ) 的对数值 (X) 进行线性回归, 得到各指标成分的回归方程、相关系数及线性范围分别为蔗糖  $Y=1.4634X+2.2044$ ,  $r=0.9996$ , 2.44~24.40  $\mu\text{g}$ ; 1-蔗果三糖  $Y=1.4607X+2.1537$ ,  $r=0.9997$ , 1.22~12.20  $\mu\text{g}$ ; 耐斯糖  $Y=1.5140X+1.9724$ ,  $r=0.9995$ , 3.02~30.16  $\mu\text{g}$ ; 1F-果呋喃糖基耐斯糖  $Y=1.5300X+1.7461$ ,  $r=0.9995$ , 3.20~31.98  $\mu\text{g}$ 。

**2.2.5 检测限和定量限** 取“2.2.2”项下混合对照品溶液适量, 加 60% 乙醇不断稀释后进样测定, 检测限依据 3 倍噪音的峰响应值 (信噪比为 3:1) 和称样量计算, 定量限依据 10 倍噪音的峰响应值 (信噪比为 10:1) 和称样量计算。结果各指标的检测限、定量限分别为蔗糖 0.022、0.050  $\mu\text{g}$ , 1-蔗果三糖 0.028、0.062  $\mu\text{g}$ , 耐斯糖 0.024、0.053  $\mu\text{g}$ , 1F-果呋喃糖基耐斯糖 0.043、0.096  $\mu\text{g}$ 。

**2.2.6 精密度试验** 精密吸取生巴戟天供试品溶液, 按“2.2.1”项下色谱条件连续进样 6 次, 测得蔗糖、1-蔗果三糖、耐斯糖、1F-果呋喃糖基耐斯糖的峰面积 RSD 分别为 3.13%、2.37%、1.91%、1.94%, 表明仪器精密度良好。

**2.2.7 稳定性试验** 精密吸取生巴戟天供试品溶液, 在制备后 0、2.5、5、7.5、10、12.5、24、48、72 h 分别进样 20  $\mu\text{L}$ , 按“2.2.1”项下色谱条件进样分析, 测得蔗糖、1-蔗果三糖、耐斯糖、1F-果呋喃糖基耐斯糖的峰面积 RSD 分别为 2.43%、1.77%、2.03%、2.98%, 表明供试品溶液在 72 h 内稳定。

**2.2.8 重复性试验** 精密称取同一批生巴戟天药材粉末 6 份, 每份 0.5 g, 按“2.2.3”项下方法制备, 并按“2.2.1”项下色谱条件进样分析, 测得蔗糖、1-蔗果三糖、耐斯糖、1F-果呋喃糖基耐斯糖质量分数的 RSD 分别为 2.67%、2.22%、2.34%、2.20%, 表明该制备方法重复性良好。

**2.2.9 加样回收率试验** 精密称取已测定指标成分含量的同一批生巴戟天粉末 9 份, 每份 0.25 g, 分别精密加入对应量的蔗糖、1-蔗果三糖、耐斯糖、1F-果呋喃糖基耐斯糖, 每一质量浓度平行 3 份, 按“2.2.2”项下方法制备, 并按“2.2.3”项下色谱条件进样分析, 测得蔗糖、1-蔗果三糖、耐斯糖、1F-果

呋喃糖基耐斯糖的平均加样回收率分别为 101.00% (RSD 为 2.01%)、101.69% (RSD 为 1.92%)、99.79% (RSD 为 2.36%)、101.29% (RSD 为 1.78%)。

### 2.3 正交试验优化酒炙巴戟天工艺

基于《广东省中药材炮制规范》(第一册)<sup>[14]</sup>,按 L<sub>16</sub>(4<sup>5</sup>)正交试验表进行设计研究巴戟天酒炙的最佳工艺参数。选用黄酒用量 (A)、闷润时间 (B)、炒制温度 (C)、炒制时间 (D)、烘干时间 (E) 为考察因素,每个因素拟定 4 个水平 (表 1)。以蔗糖、

1-蔗果三糖、耐斯糖、1F-果呋喃糖基耐斯糖共 4 种寡糖总量为指标,利用熵权法确定各成分含量的权重比,具体计算步骤参考文献方法<sup>[15]</sup>,即蔗糖含量占 21.01%、1-蔗果三糖含量占 22.17%、耐斯糖含量占 27.70%、1F-果呋喃糖基耐斯糖含量占 29.13%。各指标含量按照权重相加得分即为综合得分,总分越高越好。正交试验安排及结果见表 1,方差分析结果见表 2。由方差分析结果可以看出 (表 2),因素 A 和 D 对实验结果具有显著性影响 ( $P < 0.05$ ),

表 1 正交试验设计因素水平及结果 (n = 3)

Table 1 Design and results of orthogonal test (n = 3)

编号	因素					质量分数/(mg·g <sup>-1</sup> )				综合得分
	A/mL	B/h	C/°C	D/min	E/min	蔗糖	1-蔗果三糖	耐斯糖	1F-果呋喃糖基耐斯糖	
S1	5 (1)	0.5 (1)	60 (1)	5 (1)	30 (1)	34.62	22.57	50.20	83.49	50.50
S2	5 (1)	1.0 (2)	80 (2)	7 (2)	40 (2)	36.69	21.93	41.39	66.02	43.26
S3	5 (1)	2.0 (3)	100 (3)	9 (3)	50 (3)	17.24	8.23	11.93	17.77	13.93
S4	5 (1)	4.0 (4)	120 (4)	11 (4)	60 (4)	21.50	11.04	16.01	23.78	18.32
S5	10 (2)	0.5 (1)	80 (2)	9 (3)	60 (4)	37.04	19.36	33.49	50.80	36.15
S6	10 (2)	1.0 (2)	60 (1)	11 (4)	50 (3)	45.35	25.65	50.99	80.85	52.89
S7	10 (2)	2.0 (3)	120 (4)	5 (1)	40 (2)	38.34	19.50	37.18	58.71	39.78
S8	10 (2)	4.0 (4)	100 (3)	7 (2)	30 (1)	26.99	12.05	18.29	27.20	21.33
S9	20 (3)	0.5 (1)	100 (3)	5 (1)	40 (2)	42.77	21.60	39.40	58.15	41.63
S10	20 (3)	1.0 (2)	120 (4)	9 (3)	30 (1)	27.96	12.03	17.79	26.02	21.05
S11	20 (3)	2.0 (3)	60 (1)	7 (2)	60 (4)	62.56	27.64	64.75	103.24	67.28
S12	20 (3)	4.0 (4)	80 (2)	5 (1)	50 (3)	47.70	30.09	60.77	95.14	61.23
S13	40 (4)	0.5 (1)	120 (4)	7 (2)	50 (3)	37.31	21.31	48.59	79.39	49.15
S14	40 (4)	1.0 (2)	100 (3)	5 (1)	60 (4)	35.49	19.91	43.21	69.70	44.14
S15	40 (4)	2.0 (3)	80 (2)	11 (4)	30 (1)	41.16	22.03	39.73	61.53	42.46
S16	40 (4)	4.0 (4)	60 (1)	9 (3)	40 (2)	42.48	25.91	56.00	88.86	56.06
K <sub>1</sub>	31.50	44.36	56.68	48.91	33.84					
K <sub>2</sub>	37.54	40.36	45.78	45.26	45.18					
K <sub>3</sub>	47.80	40.86	30.26	31.80	44.30					
K <sub>4</sub>	47.95	39.24	32.08	38.83	41.47					
R	16.45	5.12	26.43	17.12	11.35					

表 2 方差分析结果

Table 2 Analysis of variance

方差来源	离差平方和	自由度	方差	F 值	显著性
A	786.315	3	262.105	13.379	$P < 0.05$
B	58.773	3	19.591	1.000	
C	1 854.569	3	618.190	31.555	$P < 0.01$
D	679.893	3	226.631	11.568	$P < 0.05$
E	319.151	3	106.384	5.430	
误差	58.770	3			

$F_{0.05}(3, 3) = 9.280$   $F_{0.01}(3, 3) = 29.500$

因素 C 对实验结果具有极显著性影响 ( $P < 0.01$ ), 因素 B 和 E 对实验结果影响不显著。由极值 R 可知 (表 1), 各因素作用的大小顺序为  $C > D > A > E > B$ , 表明黄酒用量 (因素 A)、炒制温度 (因素 C) 和炒制时间 (因素 D) 均对巴戟天中 4 种寡糖成分有较大影响, 其中炒制温度 (因素 C) 对其影响最大。按照综合得分越大越好的原则, 最佳组合为 S11 号 A<sub>3</sub>B<sub>3</sub>C<sub>1</sub>D<sub>2</sub>E<sub>4</sub> 组合最佳, 其蔗糖、1-蔗果三糖、耐斯糖、1F-果呋喃糖基耐斯糖的含量分别高于其他组合中的 4 种寡糖的含量。该结果表明, 巴戟天药材经

酒炙可促进其糖类成分的溶出，随着温度的升高和时间的延长，大分子糖类化合物受热分解生成小分子糖类化合物（如单糖和寡糖）。

### 2.4 熵权 TOPSIS 模型计算结果和聚类分析

采用 Excel 2010 版软件进行熵权 TOPSIS 模型计算。建模方法参考文献报道<sup>[15]</sup>，本实验建立初始化(6×17)决策矩阵、归一化决策矩阵、加权决策矩阵，对生巴戟天和 16 批酒巴戟天正交组进行熵

权 TOPSIS 模型分析，进行综合评价排序，如表 3 评分结果所示，巴戟天最佳炮制工艺为 S11 号 A<sub>3</sub>B<sub>3</sub>C<sub>1</sub>D<sub>2</sub>E<sub>4</sub> 组合，即 100 g 生巴戟天加入 20 mL 的黄酒，闷润 2 h，炒制温度为 60 °C，炒制 7 min 后置于 50 °C 烘箱烘 1 h，与方差分析结果一致。

采用 SPSS 22.0 软件对生巴戟天及 16 批酒巴戟天正交组进行系统聚类分析，结果如图 2 所示，所有样品可聚为 2 大类，生巴戟天药材和熵权 TOPSIS

表 3 生巴戟天和 16 批酒巴戟天正交组熵权 TOPSIS 模型分析

Table 3 Analysis of entropy weight TOPSIS model for raw and 16 orthogonal groups of MOR

编号	加酒量/mL	闷润时间/h	炒制温度/°C	炒制时间/min	烘干时间/min	$D_i^+$	$D_i^-$	$C_i$
S11	20	2.0	60	7	60	0.028	0.555	0.952
S12	20	4.0	80	5	50	0.100	0.498	0.833
S16	40	4.0	60	9	40	0.152	0.436	0.742
S0(生)	-	-	-	-	-	0.167	0.427	0.718
S6	10	1.0	60	11	50	0.162	0.410	0.716
S1	5	0.5	60	5	30	0.222	0.372	0.626
S13	40	0.5	120	7	50	0.224	0.357	0.614
S15	40	2.0	80	11	30	0.260	0.309	0.543
S2	5	1.0	80	7	40	0.263	0.309	0.540
S14	40	1.0	100	5	60	0.266	0.308	0.537
S9	20	0.5	100	11	40	0.265	0.305	0.535
S7	10	2.0	120	5	40	0.294	0.274	0.483
S5	10	0.5	80	9	60	0.325	0.245	0.430
S10	20	1.0	120	9	30	0.483	0.091	0.159
S8	10	4.0	100	7	30	0.481	0.090	0.157
S4	5	4.0	120	11	60	0.516	0.052	0.092
S3	5	2.0	100	9	50	0.567	0.000	0.000

$D_i^+$ 代表每批样本中各评价指标与正理想解的距离， $D_i^-$ 代表每批样本中各评价指标与负理想解的距离， $C_i$ 代表  $D_i^+$ 与  $D_i^-$ 以及各指标对最优解的欧氏贴近度

$D_i^+$  represents the distance between each evaluation index and positive ideal solution in each batch of samples,  $D_i^-$  represents the distance between each evaluation index and negative ideal solution in each batch of samples,  $C_i$  represents  $D_i^+$  and  $D_i^-$  and Euclidean closeness of each index to the optimal solution

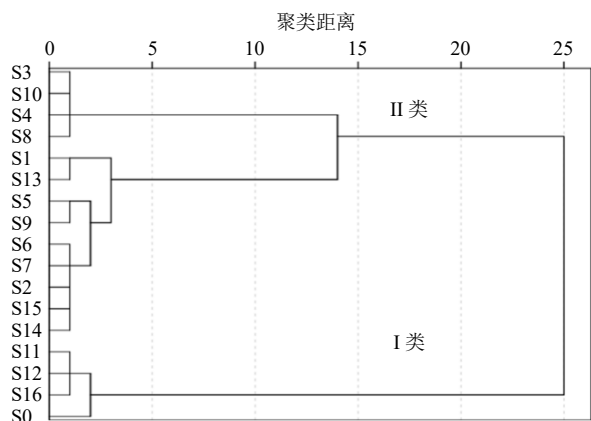


图 2 生巴戟天和 16 批酒巴戟天正交组的聚类分析结果  
Fig. 2 Cluster analysis results of raw and 16 orthogonal groups of MOR

模型综合评分前 3 的正交组聚为 I 类，其他组别聚为 II 类，该结果与熵权 TOPSIS 模型分析结果基本一致。表明本次实验所建的熵权 TOPSIS 模型准确、可靠，可用于巴戟天酒炙工艺的筛选。

### 2.5 炮制工艺验证

根据熵权 TOPSIS 模型法筛选出最优的酒巴戟天炮制工艺参数，即 100 g 生巴戟天加入 20 mL 的黄酒，闷润 2 h，炒制温度为 60 °C，炒制 7 min 后置于 50 °C 烘箱烘 1 h。精密称取 3 份生巴戟天药材，按此工艺条件重复 3 次，实验结果见表 4，蔗糖、1-蔗果三糖、耐斯糖、1F-果呋喃糖基耐斯糖的平均质量分数分别为 62.59 mg/g (RSD 为 0.42%)、27.65 mg/g (RSD 为 1.83%)、64.78 mg/g (RSD 为

表4 验证试验结果 (n = 3)

Table 4 Results of verification (n = 3)

样品	质量分数/(mg·g <sup>-1</sup> )			
	蔗糖	1-蔗果三糖	耐斯糖	1F-果呋喃糖基耐斯糖
S0(生)	40.97	23.45	55.79	92.54
S11-1	62.40	28.14	64.12	102.97
S11-2	62.89	27.13	65.05	102.99
S11-3	62.48	27.69	65.18	103.92

0.89%)、103.29 mg/g (RSD 为 0.53%)，表明本研究筛选的炮制工艺稳定、可行。同时，与生巴戟天比较，酒炙后蔗糖、1-蔗果三糖、耐斯糖、1F-果呋喃糖基耐斯糖的含量均有所增加，表明酒炙能提高巴戟天中的寡糖类成分的含量。

### 2.6 对环磷酰胺所致生精障碍的雄性小鼠生殖氧化应激的作用对比研究

生巴戟天寡糖和酒巴戟天寡糖的制备方法均参照本课题组前期的方法制备<sup>[16]</sup>。查阅文献可知<sup>[17]</sup>，临床上病人接受巴戟天寡糖胶囊为 0.6~1.2 mg/kg，按照人和动物间体表面积折算的等效剂量比值设置本次实验的巴戟天寡糖给药剂量。取雄性 KM 小鼠 (20±2)g 共 42 只，随机分为以下 7 组：正常组（给予等剂量生理盐水），模型组（给予含 75 mg/kg 环磷酰胺的生理盐水溶液），阳性药（维生素 E，VE）组（同时给予 75 mg/kg 环磷酰胺和 0.5 mg/mL 的 VE），生巴戟天寡糖低、高剂量（RMO<sub>50</sub>、RMO<sub>200</sub>）组，酒巴戟天寡糖低、高剂量（WMO<sub>50</sub>、WMO<sub>200</sub>）组（同时给予 75 mg/kg 环磷酰胺和寡糖溶液，高、低剂量分别为 200、50 mg/kg）。然后于实验分组后当天及第 4 天 8:00 时 ip 环磷酰胺，每天 9:00 时 ig 给药 1 次，自由饮食，通路抑制剂每天 ip 1 次，每天记录小鼠体质量及消耗的饲料、水，饲养环境为

相对湿度 (55±5) %，室内温度 (22±2) °C，12 h 光照，每天更换 1 次垫料，给药 3 周。

**2.6.1 雄性 KM 小鼠血液及脏器处理** 在实验操作前禁食 12 h，称定质量，乙醚麻醉，摘眼球取血。吸取全血于 4 °C 离心机中 3000 r/min 离心 10 min 用于生化指标分析，然后快速解剖，取出睾丸及附睾，用预冷的生理盐水清洗，用滤纸吸干水分，称重。附睾用于精子参数分析，取四分之一睾丸组织用 10% 甲醛固定液浸泡，用于组织病理学分析。

**2.6.2 巴戟天酒炙前后寡糖对模型雄性 KM 小鼠精子参数的影响** 将左侧附睾放进新的 2 mL 的生理盐水中，剪碎，在 37 °C 孵育箱中孵育 10 min 左右，使精子充分游离出，然后吸取全部溶液，1000 r/min 低速常温离心 1 min，制备精子混悬液。吸取 200 μL 精子混悬液，加入 800 μL 的生理盐水置于 6 孔板中（稀释 5 倍）。吸取 20 μL 稀释液充满血球计数板，将血球计数板置于光学倒置显微镜载物台上(400×)，计算精子总数、精子存活率及精子畸形率。结果如表 5 所示，与正常组相比，模型组小鼠精子总量、精子存活率和精子畸形率显著降低 (P<0.01)；与模型组相比，酒巴戟天寡糖生精作用及改善精子质量的能力明显改善，优于生巴戟天寡糖，且均具有统计学差异 (P<0.01)，说明酒炙后巴戟天“温肾助阳”作用增强，其原因可能与酒炙使巴戟天中大分子糖类化合物水解产生具有较强生物活性的寡糖类成分有关。

**2.6.3 巴戟天酒炙前后寡糖对雄性 KM 小鼠睾丸组织的影响** 取经 10% 甲醛溶液浸泡的雄性小鼠睾丸，经乙醇脱水、石蜡包埋，制备小鼠睾丸组织切片。常规 HE 染色，拍照。结果如图 3 所示，正常组小鼠睾丸曲细精管之间排列紧密，曲精细胞内各级生

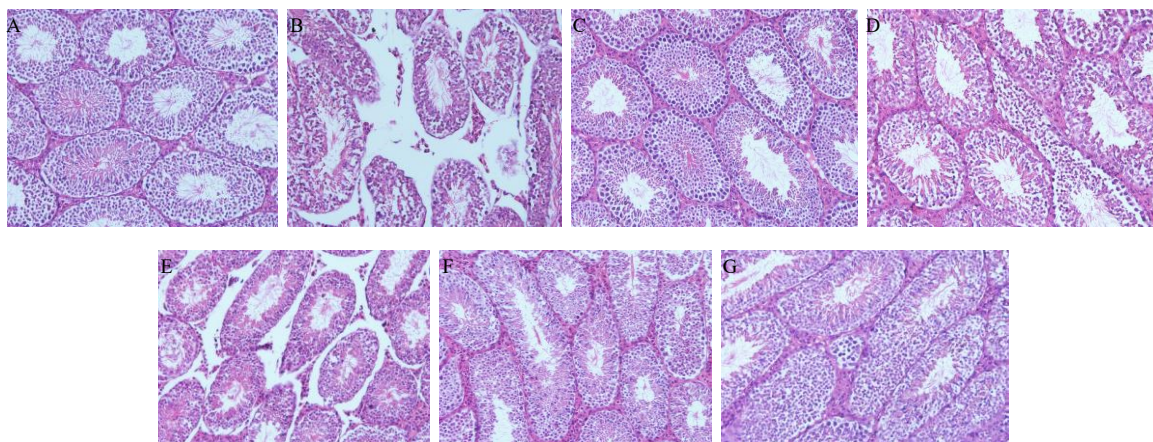
表5 酒炙前后巴戟天寡糖对环磷酰胺所致生精障碍雄性小鼠生殖氧化应激的影响 (x̄ ± s, n = 6)

Table 5 Effects of MOR oligosaccharides of raw and stir-frying with yellow wine on reproductive oxidative stress in male mice with spermatogenesis induced by cyclophosphamide (x̄ ± s, n = 6)

组别	精子总数/(×10 <sup>6</sup> mL <sup>-1</sup> )	精子存活率/%	精子畸形率/%	GSH-Px/(μmol·mL <sup>-1</sup> )	CAT/(U·mL <sup>-1</sup> )	MDA/(nmol·mL <sup>-1</sup> )
正常	2.90±0.13	85.48±5.71	8.83±2.30	646.98±96.98	8.50±1.50	3.08±1.18
模型	1.35±0.13 <sup>###</sup>	32.92±7.67 <sup>###</sup>	65.28±10.60 <sup>###</sup>	522.79±63.77 <sup>#</sup>	3.32±0.58 <sup>###</sup>	7.29±3.08 <sup>##</sup>
VE	3.34±0.60 <sup>**</sup>	57.16±12.98 <sup>**</sup>	46.48±2.16 <sup>**</sup>	626.93±91.63 <sup>*</sup>	7.57±2.68 <sup>**</sup>	5.39±2.01 <sup>*</sup>
RMO <sub>50</sub>	0.78±0.12	35.56±13.12	60.01±0.32	534.22±115.64	8.28±1.89 <sup>**</sup>	6.69±1.78
RMO <sub>200</sub>	1.45±0.15	40.26±12.78	62.84±3.76	572.85±84.54	9.07±1.93 <sup>**</sup>	6.97±2.75
WMO <sub>50</sub>	4.02±0.13 <sup>***&amp;</sup>	69.15±22.86 <sup>**&amp;</sup>	37.97±2.45 <sup>***&amp;</sup>	726.17±101.92 <sup>**&amp;</sup>	7.27±0.95 <sup>**</sup>	6.65±1.02
WMO <sub>200</sub>	3.98±1.05 <sup>***&amp;</sup>	62.53±14.45 <sup>**&amp;</sup>	36.67±2.93 <sup>***&amp;</sup>	568.69±126.79	8.76±1.94 <sup>**</sup>	6.56±2.26

与正常组比较：<sup>#</sup>P<0.05 <sup>###</sup>P<0.01；与模型组比较：<sup>\*</sup>P<0.05 <sup>\*\*</sup>P<0.01；与 RMO<sub>50</sub> 和 RMO<sub>200</sub> 组比较：<sup>&</sup>P<0.05

<sup>#</sup>P<0.05 <sup>###</sup>P<0.01 vs normal group; <sup>\*</sup>P<0.05 <sup>\*\*</sup>P<0.01 vs model group; <sup>&</sup>P<0.05 vs RMO<sub>50</sub> and RMO<sub>200</sub> groups



A-正常组 B-模型组 C-阳性药(VE)组 D-生巴戟天寡糖低剂量(RMO<sub>50</sub>)组 E-生巴戟天寡糖高剂量(RMO<sub>200</sub>)组 F-酒巴戟天寡糖低剂量(WMO<sub>50</sub>)组 G-酒巴戟天寡糖高剂量(WMO<sub>200</sub>)组

A-normal group B-model group C-positive drug (VE) group D-low dose (RMO<sub>50</sub>) group of raw MOR E-high dose (RMO<sub>200</sub>) group of raw MOR F-low dose (WMO<sub>50</sub>) group of stir-frying with yellow wine MOR G-high dose (WMO<sub>200</sub>) group of stir-frying with yellow wine MOR

图3 雄性KM小鼠睾丸病理切片显微图(HE染色, ×200)

Fig. 3 Pathological section of testis in male mice (HE staining, ×200)

精细胞排列层次分明,管腔中可见成熟的精子,且精管间质中间质细胞较大、成群分布、发育良好,未见明显的病理变化(图3-A)。模型组小鼠睾丸组织生精上皮明显变薄,生精细胞层次和数量减少,生精小管腔可见少量精子形成(图3-B)。VE组小鼠睾丸曲精细管内各级生精细胞分层排列,管腔中可见成熟的精子,精管间质中间质细胞较大,未见明显病理改变(图3-C)。图3-D~G结果显示,生巴戟天寡糖和酒巴戟天寡糖,均对环磷酰胺所致的雄性KM小鼠的睾丸病理均有不同程度的改善,其中,酒巴戟天寡糖改善效果较生巴戟天寡糖改善效果好。

**2.6.4 巴戟天酒炙前后对模型雄性KM小鼠血清中GSH-Px、CAT活性及丙二醛含量的影响** 采用试剂盒法测定雄性KM小鼠血清中GSH-Px、CAT的活性及丙二醛含量。结果如表5所示,与正常组比较,模型组小鼠血清中GSH-Px、CAT活性显著降低( $P<0.05$ 、 $0.01$ ),丙二醛含量显著增高( $P<0.01$ ),表明本实验造模成功。与模型组比较,生巴戟天寡糖和酒巴戟天寡糖高低剂量组小鼠中的CAT活性明显升高,均有统计学差异( $P<0.01$ ),且丙二醛含量均有所降低,但无显著性差异,酒巴戟天寡糖低剂量组的GSH-Px活性显著升高,有统计学差异( $P<0.01$ )。

### 3 讨论

#### 3.1 指标性成分的选择

虽然文献报道巴戟天中脂溶性成分(如环烯醚

萜类、蒽醌类等)具有生物活性,而且也有以其为指标进行工艺筛选的报道<sup>[18]</sup>,但该类成分与糖类成分相比,一是在巴戟天药材中含量相对较低,二是炮制用的黄酒乙醇量一般为15%~20%,并不利于脂溶性成分的溶出。而巴戟天中糖类成分约占药材的50%<sup>[9]</sup>,并且文献报道了寡糖是巴戟天发挥药效的重要物质之一,具有促进生殖、抗氧化、抗抑郁等药理活性<sup>[4-6]</sup>。《中国药典》2020年版中的巴戟天炮制品虽以耐斯糖含量作为质量控制指标<sup>[1]</sup>,但单一成分难以全面整体地反映饮片的内在质量。故本研究选取结构清晰、对照品易得的蔗糖、1-蔗果三糖、耐斯糖、1F-果呋喃糖基耐斯糖共4种寡糖单体共同作为酒巴戟天炮制工艺筛选的指标性成分。

#### 3.2 巴戟天酒炙工艺筛选方法的比较

熵权TOPSIS模型是有限方案多目标决策分析的一种方法,该法对样本无特殊要求,分析简便,采用该模型可用熵权替代经验加权,有效的规避了主观偏好性,将主观思维严谨化<sup>[19]</sup>。因此,本实验引入该模型对16批酒巴戟天正交组中4种寡糖类成分含量的归一化值进行加权,进而综合筛选出巴戟天酒炙的最佳炮制工艺,该结果与正交试验方差分析和聚类分析结果一致,表明该模型简便、可行,用于巴戟天酒炙工艺的筛选更具逻辑性和科学性。

#### 3.3 药效模型的选择

睾丸氧化应激损伤是男性不育的重要影响因素,环磷酰胺是一种抗肿瘤和免疫抑制类药物,其在发挥药效的同时,也会影响人体正常细胞的增殖

与分化<sup>[20]</sup>；其中，氧化应激损伤可能是环磷酸胺引起睾丸生精障碍的主要原因之一<sup>[21]</sup>；而且本课题组前期已证明了巴戟天寡糖具有精子保护的作用<sup>[5]</sup>。因此，为了排除巴戟天药材粗提物中脂溶性成分、大分子糖类化合物及无机盐离子、蛋白、色素等杂质对药效的影响，本研究在筛选出的最佳炮制工艺（S11组合）基础上，参照课题组前期的方法<sup>[15]</sup>将生巴戟天药材和酒巴戟天药材中的寡糖提取与纯化后，再进行炮制前后药效的对比研究。结果通过对巴戟天酒炙前后寡糖药效的对比发现，寡糖极有可能是巴戟天发挥生殖作用的主要物质基础之一，即巴戟天经过酒炙后与生品比较，4种寡糖含量均有所增高，即蔗糖约高出1.5倍、1-蔗果三糖和耐斯糖约高出1.2倍、1F-果呋喃糖基耐斯糖约高出1.1倍。少、弱、畸精子症是生精障碍的表现之一，在中医学上属于“精寒”“精冷”等范畴，肾虚是其发病的关键；行不足者，温之以气，阳气的温煦不足导致精子畸形率的增高<sup>[22]</sup>，而巴戟天酒炙后能引导药物直达病所，提高了精子总数和存活率、降低了精子畸形率，效果较生巴戟天明显。这些结果从侧面表明了酒巴戟天发挥“温肾助阳”的作用可能与酒炙能使巴戟天中糖类成分溶出增加，在炒制过程中，受热分解生成单糖和寡糖等化合物有关。后期，本课题组将继续以生殖氧化应激作用为切入点，深入挖掘酒炙后巴戟天“温肾助阳”的物质基础与科学内涵，为传统中药的炮制机理奠定基础。

本研究首次结合多指标成分，采用正交-TOPSIS法优选出巴戟天酒炙最佳炮制工艺，为巴戟天饮片的炮制工艺筛选、开发利用及炮制品质量标准提供了参考；比较酒炙前后巴戟天寡糖对环磷酸胺所致的生精障碍雄性小鼠生殖氧化应激作用，为巴戟天酒炙的合理性和有效性提供科学依据。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 83-84.
- [2] 倪建成, 卢柱华, 莫舒云, 等. 巴戟天化学成分的研究 [J]. 中成药, 2021, 43(5): 1212-1216.
- [3] Zhang J H, Xin H L, Xu Y M, *et al.* *Morinda officinalis* How-A comprehensive review of traditional uses, phytochemistry and pharmacology [J]. *J Ethnopharmacol*, 2018, 213: 230-255.
- [4] 邓朔, 宓为峰, 徐意, 等. 巴戟天寡糖对抑郁症患者血浆 BDNF, GDNF, VEGF 和 IGF-1 水平的影响 [J]. 中国

新药杂志, 2017, 26(20): 2454-2458.

- [5] 丁平, 梁英娇, 刘瑾, 等. 巴戟天寡糖对小鼠精子生成作用的研究 [J]. 中国药理学杂志, 2008, 43(19): 1467-1470.
- [6] Chen D L, Li N, Lin L, *et al.* Confocal mirco-Raman spectroscopic analysis of the antioxidant protection mechanism of the oligosaccharides extracted from *Morinda officinalis* on human sperm DNA [J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 153(1): 119-124.
- [7] Wu Z Q, Chen D L, Lin F H, *et al.* Effect of bajijiasu isolated from *Morinda officinalis* F. C. how on sexual function in male mice and its antioxidant protection of human sperm [J]. *J Ethnopharmacol*, 2015, 164: 283-292.
- [8] 郎霞, 张海虹, 李会芳. 巴戟天治疗抑郁症在整合药理学下的作用机制探索 [J]. 药物评价研究, 2019, 42(1): 64-71.
- [9] 田少雄, 孙树周. 不同巴戟天炮制品中糖的分布与含量测定 [J]. 中国当代医药, 2011, 18(5): 42-43.
- [10] 景海漪, 史辑, 贾天柱. 巴戟天的炮制历史沿革 [J]. 中国药房, 2013, 24(27): 2575-2577.
- [11] 王晓奇, 刘立维. 巴戟天的炮制历史沿革 [J]. 中成药, 1994, 16(4): 26.
- [12] 王斌, 梁伟龙, 林钦贤, 等. 正交试验法优选酒香附炮制工艺 [J]. 亚太传统医药, 2021, 17(2): 40-43.
- [13] 史娟兰. 炮制对巴戟天化学成分影响的研究进展 [J]. 东南园艺, 2019, 7(6): 66-70.
- [14] 广东省食品药品监督管理局. 广东省中药饮片炮制规范 [S]. 第一册. 广东: 广东科技出版社, 2011: 48-51.
- [15] 顾志荣, 王亚丽, 孙宇靖, 等. 熵权 TOPSIS 模型在甘肃产当归药材综合质量评价中的应用 [J]. 中药材, 2014, 37(9): 1549-1553.
- [16] 丁平, 徐鸿华. 一种巴戟天总寡糖的制备方法: 广东, N1587271 [P]. 2005-03-02.
- [17] 王朔, 董晓杰, 江涛, 等. 巴戟天寡糖胶囊治疗抑郁症 60 例疗效观察及安全性评价 [J]. 安徽医药, 2021, 25(6): 1232-1235.
- [18] 陈敏, 陈红, 杨成梓. 不同炮制方法对巴戟天中总蒽醌含量的影响 [J]. 亚太传统医药, 2013, 9(1): 38-39.
- [19] 许煜迪, 周萍, 刘颖, 等. 制首乌 4 种炮制过程中物质基础共性变化规律分析 [J]. 中国中药杂志, 2021, 46(3): 614-619.
- [20] Turner T T, Lysiak J J. Oxidative stress: A common factor in testicular dysfunction [J]. *J Androl*, 2008, 29(5): 488-498.
- [21] 赵红乐, 金保方. 环磷酸胺睾丸毒性研究进展 [A] // 中华中医药学会第十四次男科学术大会论文集 [C]. 中华中医药学会: 中华中医药学会, 2014: 4.
- [22] 李波, 陈广辉, 申玉行, 等. 补肺壮精方对精子形态、精浆生化及精液参数的影响 [J]. 河北中医药学报, 2018, 33(2): 7-9.

[责任编辑 郑礼胜]