

· 制剂与工艺 ·

响应面法结合熵权法多指标优选蜘蛛香提取工艺

付洋¹,程盛勇¹,陈慧¹,苑天红²,张玥²,杨军³,罗喜荣^{1*}

(1. 贵州医科大学药学院,贵州 贵阳 550025; 2. 贵州医科大学基础医学院,贵州 贵阳 550025; 3. 中国科学院地球化学研究所,贵州 贵阳 550081)

摘要 目的:优化蜘蛛香的超声提取工艺。方法:采用一测多评法测定蜘蛛香中新绿原酸、绿原酸、咖啡酸、异绿原酸 B、橙皮苷、异绿原酸 A、异绿原酸 C、乙酰缬草三酯和缬草三酯的含量,以乙醇体积分数、液料比、提取时间为考察因素,用熵权法赋权计算蜘蛛香中 9 种成分提取量综合评分为评价指标,通过 Box-Behnken 响应面法优选蜘蛛香提取工艺。结果:优化提取工艺为:药材加 56 倍量的 66% 乙醇,超声(200 W,35 kHz)提取 34 min。验证试验表明各指标成分提取量及综合评分 RSD 均小于 3%。结论:该提取工艺稳定、可行,有效成分提取率较高,适用于蜘蛛香的提取。

关键词 蜘蛛香;响应面法;熵权法;多指标;超声提取;一测多评法

中图分类号:R283.6 文献标识码:A 文章编号:1001-4454(2021)02-0404-05

DOI:10.13863/j.issn1001-4454.2021.02.028

Study on the Optimization of the Extraction Technology of *Valeriana jatamansi* Rhizomes and Roots Based on Response Surface Method Combined with Entropy Weight Method

FU Yang¹, CHENG Sheng-yong¹, CHEN Hui¹, YUAN Tian-hong², ZHANG Yue², YANG Jun³, LUO Xi-rong¹

(1. College of Pharmacy, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, China; 2. College of Basic Medicine, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, China; 3. Institute of Geochemistry, Chinese Academy of Sciences, Guiyang 550081, China)

Abstract Objective: To optimize of ultrasonic extraction technology of *Valeriana jatamansi* rhizomes and roots. Methods: The contents of new chlorogenic acid, chlorogenic acid, caffeine, isochlorogenic acid B, hesperidin, isochlorogenic acid A, isochlorogenic acid C, acevaltratum and valepotriate in *Valeriana jatamansi* rhizomes and roots were quantitative analysis by QAMS method. Using the ethanol concentration, liquid-material ratio and extraction time as investigation factors, the entropy weight method was used to calculate the comprehensive scores of 9 components contents in *Valeriana jatamansi* rhizomes and roots, the Box-Behnken response surface methodology was adopted to optimize the extraction process of *Valeriana jatamansi* rhizomes and roots. Results: The optimum extraction process was that the medicinal materials were extracted by ultrasound(200 W, 35 kHz) for 34 min with 56 times amount of 66% ethanol. The results of verification test showed that RSD of the contents of components and the comprehensive scores of each index was less than 3%. Conclusion: The extraction process is stable and feasible, and the extraction rate of effective components is high. It is suitable for the extraction of *Valeriana jatamansi* rhizomes and roots.

Key words Rhizomes and roots of *Valeriana jatamansi* Jones; Response surface method; Entropy weight method; Multiple indexes; Ultrasonic extraction; QAMS

蜘蛛香系败酱科缬草属植物蜘蛛香 *Valeriana jatamansi* Jones 的干燥根茎及根,是 2020 年版中国药典唯一收录的缬草类生药,广泛分布于贵州、四川、云南等地,具有理气止痛、消食止泻、祛风除湿、镇静安神等功效,用于治疗脘腹胀痛、食积不化、腹泻痢疾、风湿痹痛、腰膝酸软、失眠^[1]。蜘蛛香主要含有环烯醚萜类、挥发油类、黄酮类、酚酸类和多糖类等化合物,其中乙酰缬草三酯和缬草三酯属环烯

醚萜类物质,为蜘蛛香的特征性化合物,具有镇静催眠、抗焦虑、抗抑郁及抗肿瘤等作用;新绿原酸、绿原酸、咖啡酸、异绿原酸 A、异绿原酸 B 和异绿原酸 C 为酚酸类物质,具有抗氧化、保护心血管、降血糖、降血脂、抗菌及抗病毒等作用;橙皮苷系黄酮类物质,具有抗炎、抗心律失常、抗肿瘤及保肝等作用,共同构成蜘蛛香发挥临床疗效的物质基础^[2-5]。

课题组一直致力于蜘蛛香的质量控制、药效物

收稿日期:2020-08-18

基金项目:贵州省联合基金项目(黔科合 LH 字[2014]7091 号);贵州省社发攻关项目(黔科合 SY 字[2015]3032 号);贵州省中药现代化专项项目(黔科合 ZY 字[2012]3010 号)

作者简介:付洋(1995-),男,在读硕士研究生,专业方向:药物新剂型、新技术及药代动力学研究;Tel:0851-88416164, E-mail:1282169822@qq.com。

* 通讯作者:罗喜荣, Tel:0851-88416164, E-mail:1341323603@qq.com。

质基础和制剂工艺研究,笔者前期应用一测多评法测定了蜘蛛香中新绿原酸、绿原酸、咖啡酸、异绿原酸 B、橙皮苷、异绿原酸 A、异绿原酸 C、乙酰缬草三酯、缬草三酯等 9 个成分含量^[6-8]。基于此,本研究采用一测多评法测定蜘蛛香中 9 个成分含量,利用熵权法对各指标成分赋权分析,通过 Box-Behnken 响应面优选蜘蛛香提取工艺,旨在为蜘蛛香药材资源的开发利用提供参考。

1 仪器与材料

1.1 仪器 Agilent 1260 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司);BSA224S 电子天平(赛多利斯科学仪器有限公司);UC-10H 超声波清洗器(上海泰坦科技股份有限公司)。

1.2 材料 实验用蜘蛛香药材于 2019 年 8 月采自贵州惠水,经贵州医科大学药学院覃容贵教授鉴定为败酱科植物蜘蛛香 *Valeriana jatamansi* Jones 的干燥根茎及根,粉碎并过 60 目筛,备用;绿原酸(批号 MUST-15041814)对照品购自成都曼思特生物科技有限公司;乙腈为色谱纯,水为娃哈哈纯净水;其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 9 个成分的定量测定

2.1.1 对照品溶液的制备:精密称取绿原酸对照品适量,加甲醇溶解、定容,制成质量浓度为 56.57 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液的制备:精密称取蜘蛛香药材粉末 0.5 g,按“2.2”和“2.3”项下试验条件进行超声(200 W, 35 kHz)提取,0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.1.3 色谱条件:色谱柱: Diamonsil[®] C₁₈(250 mm \times 4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈(A)-0.1% 甲酸水(B),梯度洗脱(0~18 min, 12%~30% A; 18~20 min, 30%~32% A; 20~23 min, 32%~40% A; 23~25 min, 40% A; 25~33 min, 40%~53% A; 33~90 min, 53%~85% A);检测波长:327 nm(0~33 min, 检测新绿原酸、绿原酸、咖啡酸、异绿原酸 B、橙皮苷、异绿原酸 A、异绿原酸 C), 256 nm(33~90 min, 检测乙酰缬草三酯、缬草三酯);体积流量:1.0 mL/min;柱温:30 $^{\circ}\text{C}$;进样量:10 μL 。在此条件下,分别进样分析绿原酸对照品溶液、供试品溶液,色谱结果显示,各待测成分色谱峰与相邻峰的分离度均大于 1.5,理论板数以新绿原酸峰计不低于 3 000,色谱图见图 1。

2.1.4 方法学考察:精密吸取“2.1.1”项下对照品溶液 1、3、5、10、15、20 μL ,按“2.1.3”项下色谱条件测

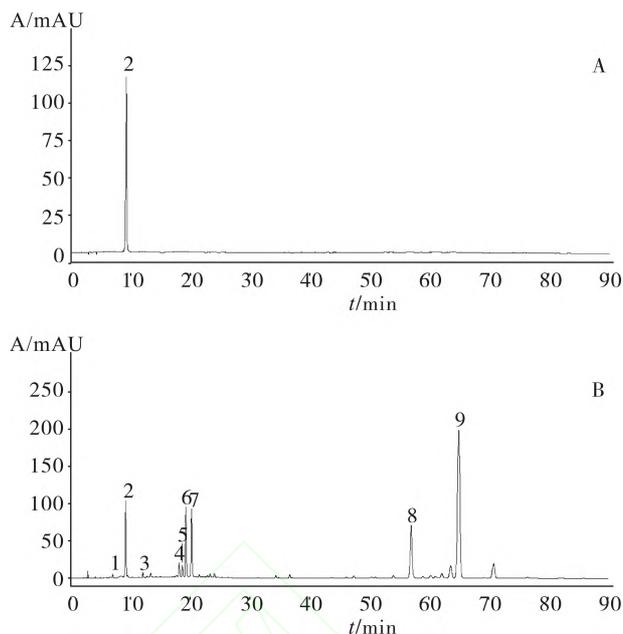


图 1 绿原酸对照品(A)与蜘蛛香供样品(B)的 HPLC 色谱图

1. 新绿原酸 2. 绿原酸 3. 咖啡酸 4. 异绿原酸 B 5. 橙皮苷
6. 异绿原酸 A 7. 异绿原酸 C 8. 乙酰缬草三酯 9. 缬草三酯

定,以对照品进样量为横坐标(X)、峰面积为纵坐标(Y)进行线性回归,得回归方程 $Y=3\ 029.5X-4.2933$ ($r=0.9996$),表明绿原酸在 0.057~1.133 μg 范围内线性关系良好。方法学考察结果显示,精密度[绿原酸峰面积 RSD 为 1.06% ($n=6$)]、稳定性[绿原酸峰面积 RSD 为 1.17% ($n=6$)]、重复性[绿原酸含量 RSD 为 1.91% ($n=6$)]、加样回收率[绿原酸平均加样回收率为 102.49%, RSD 为 1.59% ($n=6$)]均符合 2020 年版中国药典(四部)要求^[1]。

2.1.5 样品测定:取“2.1.2”项下供试品溶液按“2.1.3”项下色谱条件测定,根据回归方程计算绿原酸含量。笔者报道绿原酸对新绿原酸、咖啡酸、异绿原酸 B、橙皮苷、异绿原酸 A、异绿原酸 C、乙酰缬草三酯和缬草三酯的相对校正因子分别为 0.989、0.440、0.935、8.729、0.918、0.865、1.518 和 1.498,据此计算其余 8 种成分含量^[8]。

2.2 单因素试验

2.2.1 乙醇体积分数:精密称取蜘蛛香药材粉末 0.5 g,分别加入 50 mL/g 体积分数为 10%、30%、50%、70%、90% 的乙醇,超声提取 20 min,测定各指标成分提取量。结果当乙醇体积分数为 70% 时,9 种成分提取总量最大,故选择 50%~90% 乙醇体积分数进行响应面优选,见图 2-A。

2.2.2 液料比:精密称取蜘蛛香药材粉末 0.5 g,

分别加入 20、35、50、65、80 mL/g 的 70%乙醇,超声提取 20 min,测定各指标成分提取量。结果当液料比 ≥ 50 mL/g,9 种成分提取总量趋于平缓,因此将响应面试验液料比设为 35~65 mL/g,见图 2-B。

2.2.3 提取时间:精密称取蜘蛛香药材粉末 0.5 g,加入 50 mL/g 的 70%乙醇,分别超声提取 10、20、30、40、50 min,测定各指标成分提取量。结果当提取时间 ≥ 30 min,9 种成分提取总量趋于稳定,由此响应面试验提取时间设定为 20~40 min,见图 2-C。

2.3 响应面试验

2.3.1 试验设计与结果:在单因素试验基础上,以

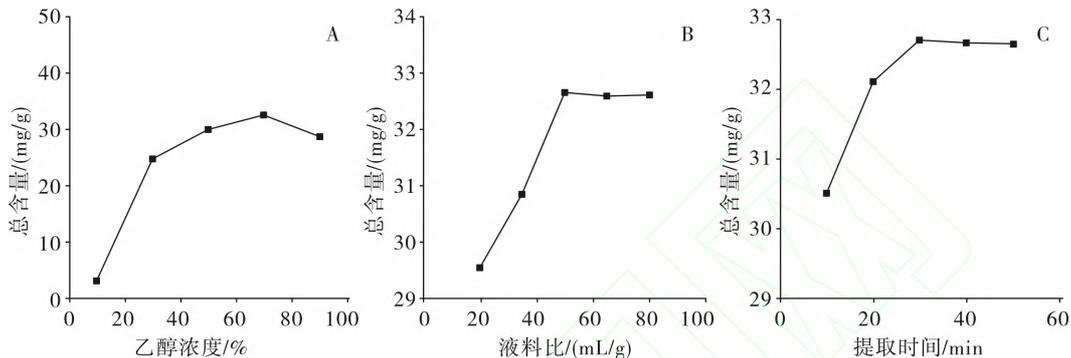


图 2 单因素试验结果

乙醇体积分数(A)、液料比(B)、提取时间(C)为考察因素,各指标成分提取量为评价指标,综合评分(M)为响应值,采用 Box-Behnken 响应面试验设计筛选各因素最优组合条件。因素与水平见表 1,试验设计与结果见表 2。

表 1 因素与水平

水平	因素		
	A 乙醇浓度/%	B 液料比/(mL/g)	C 提取时间/min
-1	50	35:1	20
0	70	50:1	30
1	90	65:1	40

表 2

Box-Behnken 响应面试验设计与结果

试验号	因素			指标含量/(mg/g)									综合评分 M
	A 乙醇浓度	B 液料比	C 提取时间	新绿原酸	绿原酸	咖啡酸	异绿原酸 B	橙皮苷	异绿原酸 A	异绿原酸 C	乙酰缬草三酯	缬草三酯	
1	-1	-1	0	0.102	2.353	0.017	0.247	3.545	1.804	1.787	2.670	16.893	3.315
2	1	-1	0	0.051	1.125	0.016	0.069	2.541	1.079	1.045	3.217	18.129	3.040
3	-1	1	0	0.109	2.409	0.019	0.254	4.221	2.006	1.901	2.659	16.891	3.441
4	1	1	0	0.052	1.099	0.015	0.069	2.741	1.183	1.121	3.205	18.218	3.091
5	-1	0	-1	0.112	2.445	0.016	0.252	4.108	1.834	1.821	2.516	16.868	3.390
6	1	0	-1	0.050	1.168	0.014	0.069	2.798	1.249	1.132	3.202	18.318	3.126
7	-1	0	1	0.115	2.406	0.018	0.257	4.212	2.030	1.927	2.614	16.813	3.434
8	1	0	1	0.054	1.182	0.015	0.071	2.830	1.094	1.059	3.198	18.303	3.106
9	0	-1	-1	0.103	2.364	0.017	0.280	2.622	1.998	1.889	3.152	18.106	3.415
10	0	1	-1	0.106	2.370	0.021	0.263	4.357	1.988	1.870	3.201	18.130	3.635
11	0	-1	1	0.101	2.361	0.017	0.285	3.697	2.001	2.040	3.208	18.081	3.569
12	0	1	1	0.106	2.410	0.020	0.292	4.447	2.102	2.061	3.207	18.214	3.699
13	0	0	0	0.103	2.409	0.019	0.290	4.428	2.072	2.023	3.198	18.121	3.677
14	0	0	0	0.104	2.419	0.019	0.288	4.408	2.055	2.025	3.190	18.187	3.681
15	0	0	0	0.104	2.408	0.018	0.297	4.511	2.110	2.027	3.203	18.206	3.703

2.3.2 综合评分计算:熵权法是一种确定指标权重的客观赋权法,信息熵作为体系混乱程度的度量,除了度量数据包含的信息量,还可用于确定多指标评价系统中各指标权重^[9]。将表 2 中各指标成分提取量数据经归一化处理[指标成分=(实测值-最小值)/(最大值-最小值)],消除指标之间量纲和量级的影

响后,应用熵权法计算得到新绿原酸、绿原酸、咖啡酸、异绿原酸 B、橙皮苷、异绿原酸 A、异绿原酸 C、乙酰缬草三酯、缬草三酯的权重值分别为 0.1199、0.1171、0.0866、0.1385、0.1255、0.1041、0.1134、0.0797、0.1150。按 $M = \text{新绿原酸含量} \times 0.1199 + \text{绿原酸含量} \times 0.1171 + \text{咖啡酸含量} \times 0.0866 + \text{异绿原酸 B 含}$

量 $\times 0.1385$ +橙皮苷含量 $\times 0.1255$ +异绿原酸 A 含量 $\times 0.1041$ +异绿原酸 C 含量 $\times 0.1134$ +乙酰缬草三酯含量 $\times 0.0797$ +缬草三酯含量 $\times 0.1150$, 计算不同试验号下各指标成分综合评分, 结果见表 2。

2.3.3 模型建立及方差分析: 利用 Design-Expert 10.0.7 软件对表 2 中 M 数据进行多元二次回归拟合, 得回归方程 $M = -2.606 + 0.13447 A + 0.0464 B +$

$0.0358 C - 0.000975 A^2 - 0.000331 B^2 - 0.000327 C^2 - 0.000063 AB - 0.000079 AC - 0.000151 BC$ ($R^2 = 0.9889$)。对模型进行方差分析, 结果见表 3。由表 3 可知, 该回归模型极显著, 失拟项不显著, 说明其拟合度及预测性良好; 模型的 A 、 B 和 A^2 项影响极显著, B^2 项影响显著, 表明各因素与综合评分间并非简单的线性关系。

表 3

方差分析结果

方差来源	平方和	自由度	均方	F	P	显著性
模型	0.8011	9	0.0890	49.63	0.0002	极显著
A	0.1852	1	0.1852	103.25	0.0002	极显著
B	0.0348	1	0.0348	19.38	0.0070	极显著
C	0.0073	1	0.0073	4.06	0.1002	不显著
AB	0.0014	1	0.0014	0.79	0.4138	不显著
AC	0.0010	1	0.0010	0.56	0.4867	不显著
BC	0.0020	1	0.0020	1.14	0.3344	不显著
A^2	0.5620	1	0.5620	313.35	<0.0001	极显著
B^2	0.0205	1	0.0205	11.42	0.0197	显著
C^2	0.0040	1	0.0040	2.20	0.1977	不显著
残差	0.0090	5	0.0018			
失拟项	0.0086	3	0.0029	14.68	0.0645	不显著
纯误差	0.0004	2	0.0002			
总和	0.8100	14				

2.3.4 响应面分析与优化: 利用 Design Expert 10.0.7 软件根据模型绘制各因素交互作用对综合评分影响的响应面图, 见图 3。响应曲面坡度越大表明该因素对响应值影响越大, 对比图 3 响应面图曲面坡度可知各因素对综合评分影响大小为乙醇浓度(A)>液料比(B)>提取时间(C); 等高线的形状越趋向椭圆表示因素交互作用越强, 越趋向圆形则因素交互作用越弱, 由图 3 等高线图可知各因素等高线未趋向椭圆, 说明各因素交互作用不明显。应用软件预测最佳提取工艺为: 乙醇浓度 65.74%、液料比 56.21 mL/g、提取时间 33.71 min, 综合评分为 3.722。

2.3.5 模型验证试验 为便于实际操作将最佳提取工艺参数调整为乙醇浓度 66%、液料比 56 mL/g、提取时间 34 min, 据此条件进行 3 次验证试验, 结果平均综合评分为 3.691 (RSD<1%), 与模型预测值 3.722 的偏差为 0.833%, 说明该优化提取工艺稳定、重复性好、可操作性强, 结果见表 4。

3 讨论

中药临床疗效的发挥是多种活性成分共同作用的结果, 单一指标提取物不足以表征中药质量和药效信息, 对中药多组分同时检测和提取, 能较好地反映中药的整体提取信息和质量信息。本实

验采用一测多评法结合多指标综合评分法优选蜘蛛香超声提取工艺, 可最大限度地同时获得蜘蛛香中 9 个成分、3 种类型化合物, 符合中药多组分、多靶点作用特点, 利于蜘蛛香的质量控制、临床用药和制剂开发。

多指标控制和优化是中药生产的研究热点, 但中药功效成分较多且含量差异较大, 难以同步最大化提取, 故其指标权重的确定是优选提取工艺的关键和难点。相对于主观赋权法, 熵权法精度较高、客观性强。本实验采用响应面法结合熵权法确定了蜘蛛香最佳提取工艺, 优化结果科学可靠。

参 考 文 献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020.
- [2] 杨军, 龙庆德, 罗喜荣, 等. 超临界二氧化碳萃取蜘蛛香油工艺的研究[J]. 时珍国医国药, 2012, 23(1): 157-158.
- [3] 严永旺, 肖兰, 周旭, 等. 绿原酸的药理作用及药用研发对策[J]. 中国药房, 2017, 28(19): 2729-2732.
- [4] 李祖晟. 二咖啡酰奎宁酸药理实验研究进展[J]. 医学综述, 2004, 10(4): 249-251.
- [5] 李丽, 任周新, 赵鹏, 等. 橙皮苷及橙皮素抗肿瘤药理活性研究进展[J]. 中医学报, 2018, 33(12): 2304-2308.

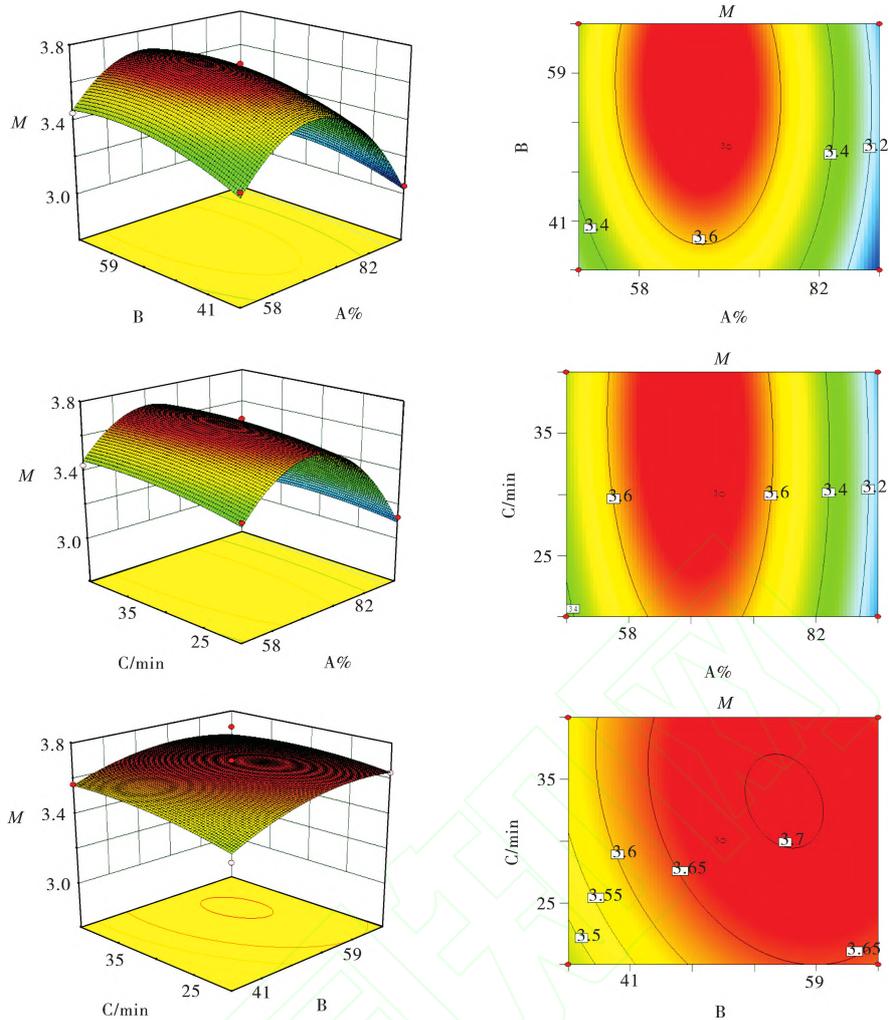


图 3 乙醇浓度(A)、液料比(B)、提取时间(C)交互作用对综合评分影响的响应面图

表 4

工艺验证结果

试验号	含量/(mg/g)									综合评分 M
	新绿原酸	绿原酸	咖啡酸	异绿原酸 B	橙皮苷	异绿原酸 A	异绿原酸 C	乙酰缬草三酯	缬草三酯	
1	0.109	2.512	0.019	0.304	4.539	2.110	2.028	3.124	17.960	3.685
2	0.111	2.491	0.020	0.310	4.666	2.075	2.008	3.094	17.929	3.687
3	0.110	2.537	0.020	0.302	4.580	2.129	2.013	3.129	18.018	3.700
均值	0.110	2.514	0.020	0.305	4.595	2.105	2.016	3.116	17.969	3.691
RSD/%	1.010	0.920	2.320	1.370	1.410	1.310	0.520	0.610	0.250	0.220

[6] 程盛勇,付洋,郁林娜,等. 蜘蛛香 UPLC 指纹图谱研究[J]. 中药材,2019,42(5):1080-1084.

[7] 刘开萍,程盛勇,郁林娜,等. 蜘蛛香总缬草三酯自微乳的制备及质量评价[J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(11):16-21.

[8] 付洋,程盛勇,郁林娜,等. 一测多评法测定蜘蛛香中 9 个成分的含量[J]. 药物分析杂志,2019,39(9):1666-1672.

[9] 忻晓东,张秀芳,王舒琪,等. 艾叶挥发油提取工艺研究[J]. 中药材,2020,43(1):150-154.