

基于质量源于设计 (QbD) 理念的经典名方桃红四物汤的提取工艺研究

杨艳玲¹, 李花花¹, 黄嘉怡¹, 张 翼¹, 何枢衡², 杜守颖^{1*}, 白 洁^{1*}

1. 北京中医药大学中药学院, 北京 102488

2. 亿帆医药股份有限公司, 浙江 临安 311300

摘 要: 目的 基于质量源于设计理念, 优化经典名方桃红四物汤 (Taohong Siwu Decoction, TSD) 的提取工艺。方法 以出膏率及芍药苷、阿魏酸、羟基红花黄色素 A 的提取率作为 TSD 提取工艺的关键质量属性 (critical quality attributes, CQAs), 筛选关键工艺参数 (critical process parameters, CPPs)。通过 Box-Behnken 设计建立数学模型, 考察 CPPs 与 CQAs 之间的交互作用。结果 方差分析结果显示, 所建模型的方差均有显著性差异 ($P < 0.05$), 且失拟值不显著, 表明模型具有统计学意义。基于以上结果, 建立提取工艺的设计空间, 对空间进行优化, 得到最佳提取工艺为提取次数 2 次, 提取时间 40~80 min, 加水量 11~15 倍。所得制剂中间体出膏率为 49.48%, 芍药苷提取率为 2.53 mg/g, 阿魏酸提取率为 0.30 mg/g, 羟基红花黄色素 A 提取率为 0.58 mg/g。结论 TSD 提取工艺稳定, 所得制剂中间体与基准样品质量属性接近, 可为后续颗粒剂的研究开发奠定基础。

关键词: 经典名方; 桃红四物汤; 提取工艺; 响应面法; 质量源于设计; 出膏率; 芍药苷; 阿魏酸; 羟基红花黄色素 A; 关键质量属性; 关键工艺参数

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)02-0403-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.02.010

Research of classical prescription based on QbD concept: Optimization of extraction process for modified Taohong Siwu Decoction

YANG Yan-ling¹, LI Hua-hua¹, HUANG Jia-yi¹, ZHANG Yi¹, HE Shu-heng², DU Shou-ying¹, BAI Jie¹

1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488 China

2. Yifan Pharmaceutical Co., Ltd., Linan 311300, China

Abstract: Objective To optimize the extraction process of Taohong Siwu Decoction (TSD, 桃红四物汤) based on the concept of quality by design (QbD). **Methods** With the extraction amount of solid matter, the extraction percentages of paeoniflorin, ferulic acid and hydroxysafflor yellow A (HSYA) as critical quality attributes (CQAs), the potential critical process parameters (CPPs) was screened. The mathematical model was established by Box-Behnken experimental design to investigate the interaction between CPPs and CQAs. **Results** Analysis of variance showed that the variance of models was significant ($P < 0.05$), and the lack-of-fit value was not significant, indicating that the model was statistically significant. Based on the results, through the establishment and optimization of the design space, the optimum extraction process of TSD was obtained as follows: two extraction times, 40—80 min extraction, and 11—15 times of water adding. The extraction rate of the intermediate was 49.48%, and the extraction percentages of paeoniflorin, ferulic acid and HSYA was 2.53 mg/g, 0.30 mg/g and 0.58 mg/g. **Conclusion** The extraction process of TSD was stable, and the quality properties of the preparation intermediates were close to reference samples, which could provide guidance for the research of subsequent granules.

Key words: classical prescription; Taohong Siwu Decoction; extraction process; response surface method; quality by design; extract rate; paeoniflorin; ferulic acid; hydroxysafflor yellow A; critical quality attributes; critical process parameters

收稿日期: 2021-08-11

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资金 (2020-JYB-ZDGG-031)

作者简介: 杨艳玲 (1996—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药新剂型与新技术研究。Tel: 18811385619 E-mail: 18811385619@163.com

*通信作者: 杜守颖, 女, 教授, 博士生导师, 从事中药新剂型与新技术研究。Tel: (010)84738615 E-mail: dushouying@263.net

白 洁, 女, 副教授, 硕士生导师, 从事中药新剂型与新技术研究。Tel: (010)84738657 E-mail: baijie22811@163.com

经典名方桃红四物汤 (Taohong Siwu Decoction, TSD) 出自清代柴得华所著《妇科冰鉴》^[1], 由酒当归、酒地黄、酒红花、酒白芍、煨桃仁及川芎组成, 功效为活血祛瘀、养血调经。TSD 临床应用广泛, 对月经不调、痛经、骨折、术后血栓等具有显著疗效^[2-4]。将经典名方开发为颗粒剂, 可推动经典名方的传承与发展, 便于临床使用与推广。

中药新药研究常以指标性成分含量最优为目的进行提取, 但根据经典名方颗粒剂的开发研究相关文件, 颗粒剂样品需与基准样品的关键质量属性 (critical quality attributes, CQAs) 接近。综合考虑制剂过程对 CQAs 产生的影响, 在质量源于设计 (quality by design, QbD) 的理念下, 对颗粒剂制备工艺过程进行控制^[5]。分析制备工艺流程, 提取工艺是质量传递中的关键部分, 也是最终产品与基准样品质量属性产生差异的源头。影响中药提取的因素主要包括 4 个方面: 药材饮片、设备、环境因素、提取条件, 其中前三者为客观因素, 提取条件为主观因素, 也是工艺考察的关键因素^[6]。本实验前期制备 15 批 TSD 基准样品, 确定以指纹图谱、指标性成分、出膏率为 CQAs, 并确定其范围。基于 QbD 理念, 以指标性成分含量、出膏率为指标, 利用响应面法优化提取工艺, 建立提取工艺的设计空间, 优选符合要求的提取条件, 使得到的制剂中间体与基准样品的 CQAs 保持一致, 为后续颗粒剂的浓缩、干燥、成型工艺奠定基础。

1 仪器与材料

1.1 仪器

BSA 224S 电子分析天平, 万分之一, 赛多利斯科学仪器北京有限公司; JM-B100002 电子天平, 十万分之一, 余姚市纪铭称重校验设备有限公司; DS-009 杰鼎陶瓷锅, 富康家居生活药馆; H22-X3 型九阳电陶炉, 杭州九阳生活电器有限公司; SHB-III 型循环水式多用真空泵, 郑州长城科工贸有限公司; Thermo Fisher U3000 高效液相色谱仪, DAD 检测器, CM7.2 色谱工作站, 赛默飞世尔科技中国有限公司; HH-6 型电热恒温水浴锅, 北京科伟永兴仪器有限公司; FD-2A 真空冷冻干燥机, 北京博医康实验仪器有限公司; DZF-6051 型真空干燥器, 北京利康达圣科技有限公司; G20 型医用离心机, 北京白洋医疗器械有限公司。

1.2 试药

酒当归饮片 [产地甘肃定西市岷县, 批号

20201201, 植物基原为伞形科当归属植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels 的干燥根]; 酒地黄饮片 (产地河南焦作市温县, 批号 1-4, 植物基原为玄参科地黄属植物地黄 *Rehmannia glutinosa* Libosch. 的干燥块根); 酒白芍饮片 (产地浙江金华市磐安, 批号 BS-12, 植物基原为毛茛科芍药属植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 的干燥根); 酒红花饮片 (产地新疆伊犁察布查尔县, 批号 YL20210105, 植物基原为菊科红花属植物红花 *Carthamus tinctorius* L. 的干燥花); 煨桃仁饮片 [产地山西运城市平陆县, 批号 20201201, 植物基原为蔷薇科桃属植物桃 *Prunus persica* (L.) Batsch 的干燥成熟种子]; 川芎饮片 (产地四川彭州市敖平镇, 批号 CX-20181116-101-YP, 植物基原为伞形科藁本属植物川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort. 的干燥根茎)。饮片均由亿帆医药股份有限公司提供, 经北京中医药大学刘春生教授鉴定均符合《中国药典》2020 年版饮片标准。对照品阿魏酸 (质量分数 99.4%, 批号 110773-201915)、羟基红花黄色素 A (HSYA, 质量分数 93.1%, 批号 111637-201810)、芍药苷 (质量分数 97.4%, 批号 110736-201842), 均购于中国食品药品检定研究院。乙腈、甲醇, Fisher 公司, 色谱级; 磷酸, Fisher 公司, 色谱纯; 水, 杭州娃哈哈集团有限公司。

2 方法与结果

2.1 TSD 制剂中间体及基准样品的制备

取酒当归 14.92 g、酒地黄 11.19 g、酒白芍 5.60 g、酒红花 3.73 g、煨桃仁 3.78 g、川芎 3.73 g, 加水回流提取。药液使用双层 300 目尼龙布滤过, 合并滤液, 水浴浓缩至稠膏状, 转移至真空干燥箱中 60 °C 干燥 3 d, 粉碎, 过 5 号筛, 即得 TSD 制剂中间体。

称取上述各味饮片于陶瓷锅中, 加水 500 mL 浸泡 40 min, 武火 (1000 W) 煮沸后以文火 (600 W) 煎煮 35 min, 双层 300 目尼龙布滤过; 药渣中加入 450 mL 水, 同法煎煮 30 min, 滤过, 合并滤液, 调整体积至 400 mL, 即得 TSD 水煎液。

精密移取上述水煎液 5 mL 于 30 mL 西林瓶中, -20 °C 冷冻 24 h, 转移至真空冷冻干燥机 (-80 °C, 真空度 10 Pa), 冷冻 3 d, 即得 1 支 TSD 基准样品。

2.2 CQAs 和关键工艺参数 (critical process parameters, CPPs) 的确定

2.2.1 CQAs 的确定 结合 TSD 中医方解理论及临

床药理活性的研究^[7-8], 将出膏率及芍药苷、阿魏酸、HSYA 的提取率作为 TSD 提取工艺的 CQAs。

2.2.2 CPPs 的筛选 采用鱼骨图进行关键工艺参数的初步筛选, 结果见图 1。根据前期研究经验及文献分析^[9-10], 可判断提取时间、提取次数和加水倍量为影响提取的关键因素。

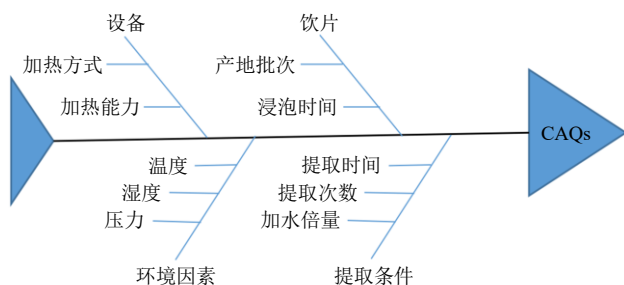


图 1 TSD 提取工艺参数筛选鱼骨图

Fig. 1 Fishbone diagram for extraction process parameters of TSD

2.3 指标性成分含量测定

2.3.1 对照品溶液的制备

(1) HSYA 对照品溶液的制备: 精密称取 HSYA 对照品适量, 加 25% 甲醇制成质量浓度为 556.00 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品母液。

(2) 阿魏酸对照品溶液的制备: 精密称取阿魏酸对照品适量, 加 70% 甲醇制成质量浓度为 507.60 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品母液。

(3) 芍药苷对照品溶液的制备: 精密称取芍药苷对照品适量, 加甲醇制成质量浓度为 1 068.67 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品母液。

2.3.2 供试品溶液的制备

(1) 基准样品供试品溶液: 按“2.1”项下方法制备基准样品, 取基准样品 1 支, 精密加入 5 mL 高纯水, 超声 30 min (功率 250 W、频率 40 kHz), 取上清液过 0.45 μm 滤膜, 用于测定芍药苷。另取基准样品 1 支, 精密加入 5 mL 25% 甲醇, 超声 30 min (功率 250 W、频率 40 kHz), 取上清液用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 用于测定阿魏酸和 HSYA。

(2) 水提液供试品溶液: 按“2.1”项下方法制备 TSD 水提液, 取适量水提液 10 000 r/min 离心 10 min (离心半径为 5.79 cm), 上清液用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 测定水提液中芍药苷、阿魏酸及 HSYA 的含量。

(3) 中间体供试品溶液: 称取 0.25 g “2.1”项下的制剂中间体, 精密加入 5 mL 高纯水或 25% 甲醇溶解, 超声 30 min (功率 250 W、频率 40 kHz),

上清液用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 测定制剂中间体中芍药苷、阿魏酸及 HSYA 的含量。

(4) 阴性供试品溶液: 依次剔除处方中缺味药饮片, 分别制备缺红花阴性样品、缺白芍阴性样品、缺当归阴性样品、缺川芎阴性样品、缺当归与川芎双阴性样品, 按照“2.1”项下 TSD 基准样品的制备方法制备阴性基准样品, 按照“2.3.2”项下基准样品供试品溶液的制备方法, 制备阴性供试品溶液。

2.3.3 色谱条件

(1) HSYA: 色谱柱为 Shim-pack GIST C₁₈ 柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-甲醇-0.02% 磷酸水溶液 (5:20:75); 检测波长 403 nm; 体积流量 1 mL/min; 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$; 进样体积 15 μL 。

(2) 阿魏酸: 色谱柱为 Inert Sustain SwiftTM C₁₈ 柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-0.1% 磷酸水溶液, 梯度洗脱: 0~5 min, 3% 乙腈; 5~25 min, 3%~9% 乙腈; 25~40 min, 9%~11% 乙腈; 40~55 min, 11%~12% 乙腈; 55~70 min, 12%~18% 乙腈; 70~90 min, 18%~34% 乙腈; 90~100 min, 34%~47% 乙腈; 100~115 min, 47%~95% 乙腈; 检测波长 230 nm; 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$; 体积流量 1 mL/min; 进样量 15 μL 。

(3) 芍药苷: 色谱柱为 Inert Sustain SwiftTM C₁₈ 柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-0.1% 磷酸水溶液 (14:86); 检测波长 230 nm; 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$; 体积流量 1.0 mL/min; 进样量 15 μL 。

2.3.4 线性关系考察 取“2.3.1”项下对照品溶液, 按“2.3.3”项下色谱条件分别测定不同质量浓度下 HSYA、阿魏酸和芍药苷的色谱峰峰面积, 以对照品溶液质量浓度为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y), 分别对 HSYA、阿魏酸和芍药苷质量浓度进行线性回归, 得回归方程分别为 HSYA $Y=0.7664X+0.4805$, $R^2=1.0000$, 线性范围 5.56~556.00 $\mu\text{g/mL}$; 阿魏酸 $Y=0.8162X+1.1242$, $R^2=1.0000$, 线性范围 5.08~507.60 $\mu\text{g/mL}$; 芍药苷 $Y=0.3395X+0.197$, $R^2=0.9995$, 线性范围 10.69~427.47 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.3.5 精密度试验 取基准样品供试品溶液 1 份, 按“2.3.3”项下色谱条件连续进样 6 次, 分别计算 HSYA、阿魏酸和芍药苷的峰面积 RSD 值为 0.32%、0.19%、1.70%, 表明仪器精密度良好。

2.3.6 稳定性试验 取基准样品供试品溶液 1 份, 按“2.3.3”项下色谱条件分别在制备后 0、2、4、8、12、24 h 进样测定, 分别计算 HSYA、阿魏酸和芍

药苷的峰面积 RSD 值为 0.75%、0.93%、2.60%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.3.7 重复性试验 取 6 份基准样品，每份为 1 支基准样品，按照“2.3.2”项方法供试品溶液，按“2.3.3”项下色谱条件进行测定，分别计算 HSYA、阿魏酸和芍药苷的质量分数 RSD 值为 0.52%、0.28%、2.00%，表明该方法重复性良好。

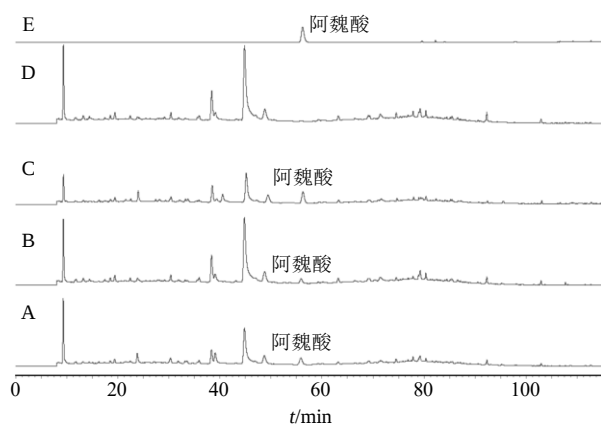
2.3.8 加样回收率试验 取基准样品 6 份，每份为 0.5 支基准样品，分别精密加入与基准样品中相应成分含量相等的对照品溶液，按“2.3.2”项方法操作得到加样供试品溶液，按“2.3.3”项色谱条件测定，分别计算 HSYA、阿魏酸和芍药苷的平均加样回收率为 101.05%、97.68%、99.93%，RSD 为 2.6%、2.1%、1.4%。

2.3.9 专属性试验 按照“2.3.2”项下方法分别制备阴性供试品溶液和全方供试品溶液，结合阿魏酸、HSYA 及芍药苷对照品检验分析方法的专属性，结果见图 2~4。结果表明，该方法的专属性良好，符合实验要求。

2.3.10 样品测定 分别取各提取工艺样品，按照“2.3.2”项方法制备供试品溶液，按照“2.3.3”项色谱条件进行测定，计算各指标成分的含量及其提取率（提取率=各指标成分质量/总投药量）。

2.4 出膏率的测定

将 TSD 水提液转移至蒸发皿中，水浴浓缩至稠膏状，60 ℃真空干燥 3 d，称定质量，计算出膏率。

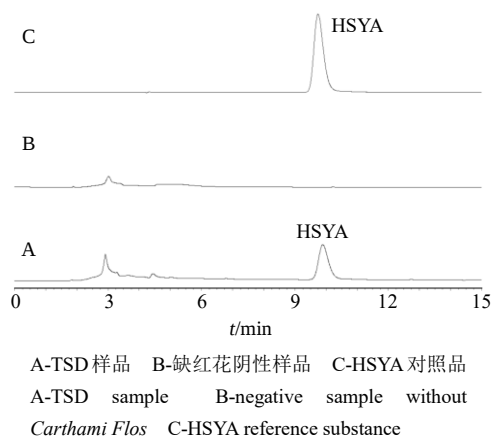


A-缺川芎阴性样品 B-缺当归阴性样品 C-TSD 样品 D-缺当归、川芎双阴性样品 E-阿魏酸对照品

A-negative sample without *Chuanxiong Rhizoma* B-negative sample without *Angelicae Sinensis Radix* C-TSD sample D-negative sample without *Angelicae Sinensis Radix* and *Chuanxiong Rhizoma* E-ferulic acid reference substance

图 2 阿魏酸专属性测定 HPLC 图

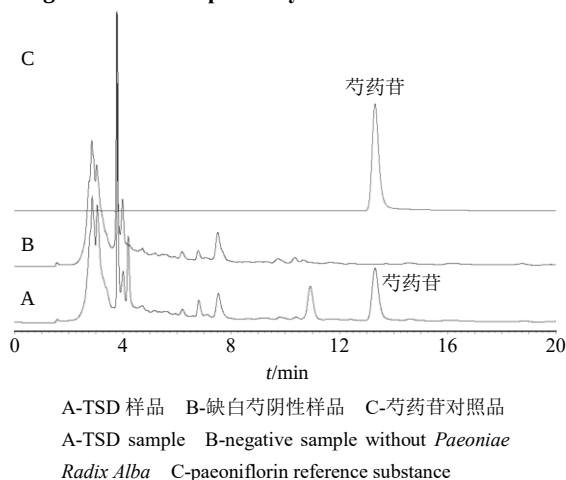
Fig. 2 HPLC of specificity determination of ferulic acid



A-TSD 样品 B-缺红花阴性样品 C-HSYA 对照品
A-TSD sample B-negative sample without
Carthami Flos C-HSYA reference substance

图 3 HSYA 专属性测定 HPLC 图

Fig. 3 HPLC of specificity determination of HSYA



A-TSD 样品 B-缺白芍阴性样品 C-芍药苷对照品
A-TSD sample B-negative sample without *Paeoniae Radix Alba* C-paeoniflorin reference substance

图 4 芍药苷专属性测定 HPLC 图

Fig. 4 HPLC of specificity determination of paeoniflorin

出膏率=干膏粉质量/饮片质量

2.5 单因素试验初步筛选提取工艺

以芍药苷、阿魏酸、HSYA 提取率及出膏率为考察指标，固定提取时间为 60 min，加水量为 400、600、800 mL 进行加水量单因素试验考察，结果见表 1。固定加水量 600 mL，提取时间为 30、60、90 min 进行提取时间单因素试验考察，结果见表 2。由结果可知，随加水量的增加，指标性成分的提取率、出膏率增加渐缓，所以将响应面加水量高水平定为 800 mL；随提取时间的延长，阿魏酸提取率、出膏率逐渐增加，但芍药苷、HSYA 提取率在 90 min 时略有下降，所以将提取时间高水平定为 90 min。

2.6 响应面试验设计

2.6.1 CQAs 和 CPPs 的确定 基于以上分析，以单处方指标成分芍药苷提取率 (Y_1)、阿魏酸提取率 (Y_2)、HSYA 提取率 (Y_3)、出膏率 (Y_4) 为 CQAs，加水量 (X_1)、提取时间 (X_2) 和提取次数 (X_3) 作

表 1 单因素加水量考察

Table 1 Single factor water addition investigation

加水量/mL	提取率/%			出膏率/%
	芍药苷	阿魏酸	HSYA	
400	1.85	0.23	0.93	28.72
600	2.18	0.29	1.06	36.20
800	2.50	0.33	1.12	36.48

表 2 单因素提取时间考察

Table 2 Single factor extraction time investigation

提取时间/min	提取率/%			出膏率/%
	芍药苷	阿魏酸	HSYA	
30	1.64	0.19	1.16	22.39
60	2.18	0.29	1.06	36.20
90	2.13	0.35	0.99	39.17

表 3 Box-Behnken 实验工艺参数及水平设计与结果

Table 3 Process parameters and levels design and results of Box-Behnken experiments

试验号	X_1 /mL	X_2 /min	X_3 /次	Y_1 / (mg·g ⁻¹)	Y_2 / (mg·g ⁻¹)	Y_3 / (mg·g ⁻¹)	Y_4 /%
1	400 (-1)	60 (0)	1 (-1)	1.90	0.23	0.94	29.37
2	600 (0)	60	2 (0)	3.12	0.41	1.28	47.94
3	600	90 (+1)	1	2.10	0.31	1.01	28.47
4	600	60	2	2.65	0.41	1.23	45.54
5	400	90	2	2.64	0.39	1.11	30.74
6	800 (+1)	90	2	3.15	0.49	1.21	49.82
7	600	30 (-1)	3 (+1)	2.81	0.33	1.37	42.86
8	600	60	2	3.23	0.46	1.27	46.03
9	600	30	1	1.76	0.21	1.13	25.29

试验号	X_1 /mL	X_2 /min	X_3 /次	Y_1 / (mg·g ⁻¹)	Y_2 / (mg·g ⁻¹)	Y_3 / (mg·g ⁻¹)	Y_4 /%
10	600	60	2	2.62	0.38	1.25	44.35
11	600	60	2	2.75	0.41	1.24	43.11
12	600	90	3	2.93	0.44	1.19	50.63
13	800	30	2	2.95	0.36	1.28	39.86
14	800	60	3	2.91	0.43	1.29	52.02
15	800	60	1	1.93	0.30	1.13	34.87
16	400	30	2	2.55	0.33	1.23	19.03
17	400	60	3	2.64	0.42	1.25	40.39

$X_2X_3 - 0.06 X_1^2 + 5.50 \times 10^{-3} X_2^2 - 0.472 X_3^2$, $Y_2 = 0.414 + 0.026 25 X_1 + 0.048 75 X_2 + 0.072 5 X_3 + 0.017 5 X_1X_2 - 0.015 X_1X_3 - 7.50 \times 10^{-4} X_1^2 - 0.020 75 X_2^2 - 0.068 25 X_3^2$, $Y_3 = 1.254 + 0.048 75 X_1 - 0.06 X_2 + 0.111 25 X_3 + 0.015 X_1X_2 - 0.037 5 X_1X_3 - 0.015 X_2X_3 - 0.033 25 X_1^2 - 0.010 75 X_2^2 - 0.068 25 X_3^2$, $Y_4 = 45.39 + 7.13 X_1 + 4.08 X_2 + 8.49 X_3 - 0.44 X_1X_2 + 1.53 X_1X_3 + 1.15 X_2X_3 - 4.09 X_1^2 - 6.44 X_2^2 - 2.14 X_3^2$ 。

芍药苷、阿魏酸、HSYA 提取率及出膏率的 2 项式回归总模型方差显著 ($P < 0.05$), 失拟值不显著, 表明所建模型有统计学意义 (表 4)。方程的拟合相关系数 R^2 均大于 88%, 说明该模型能解释绝大部分响应值的变化; 调整决定系数 R_{adj}^2 均大于 73%, 说明回归模型拟合度较好, 可以用该模型进行分析。

为 CPPs。

2.6.2 Box-Behnken 设计 利用 Design-Expert 10 软件安排 3 因素 3 水平的 17 次试验 (中心点选择重复 5 次)。

2.6.3 Box-Behnken 试验结果 根据 Box-Behnken 试验设计方案进行实验, 结果见表 3。

2.6.4 模型的建立与评价 采用 Design-Expert 10 软件对结果进行模型拟合, 各评价指标均有 2 个模型的拟合结果 P 值小于 0.05, 根据有多个拟合模型结果显著时, 选择最高阶多项式模型的原则, 故选择 2 阶多项式模型对 4 个 CQAs (芍药苷提取率、阿魏酸提取率、HSYA 提取率、出膏率) 及对应的 CPPs (加水量、提取时间、提取次数) 进行方程拟合。得到回归方程如下: $Y_1 = 2.874 + 0.15 X_1 + 0.095 X_2 + 0.45 X_3 + 0.027 5 X_1X_2 + 0.06 X_1X_3 - 0.057 5$

表 4 回归模型方差分析结果

Table 4 ANOVA results of regression model

指标	连续 P 值	失拟项 P 值	R_{adj}^2	R^2
芍药苷	0.023 1	0.873 0	0.739 1	0.885 9
阿魏酸	0.003 2	0.817 5	0.901 5	0.956 9
HSYA	0.002 5	0.241 4	0.945 1	0.976 0
出膏率	0.022 3	0.026 3	0.836 9	0.928 6

2.6.5 响应面分析 芍药苷的等高线及响应面分析见图 5, 其中图 5-A 表示提取时间和加水量对芍药苷的影响。当提取次数固定为 2 次时, 加水量等高线密度高于提取时间, 即加水量对芍药苷影响较大; 图 5-B 表示提取次数和加水量对芍药苷的影响, 当提取时间固定为 60 min 时, 提取次数的等高线密

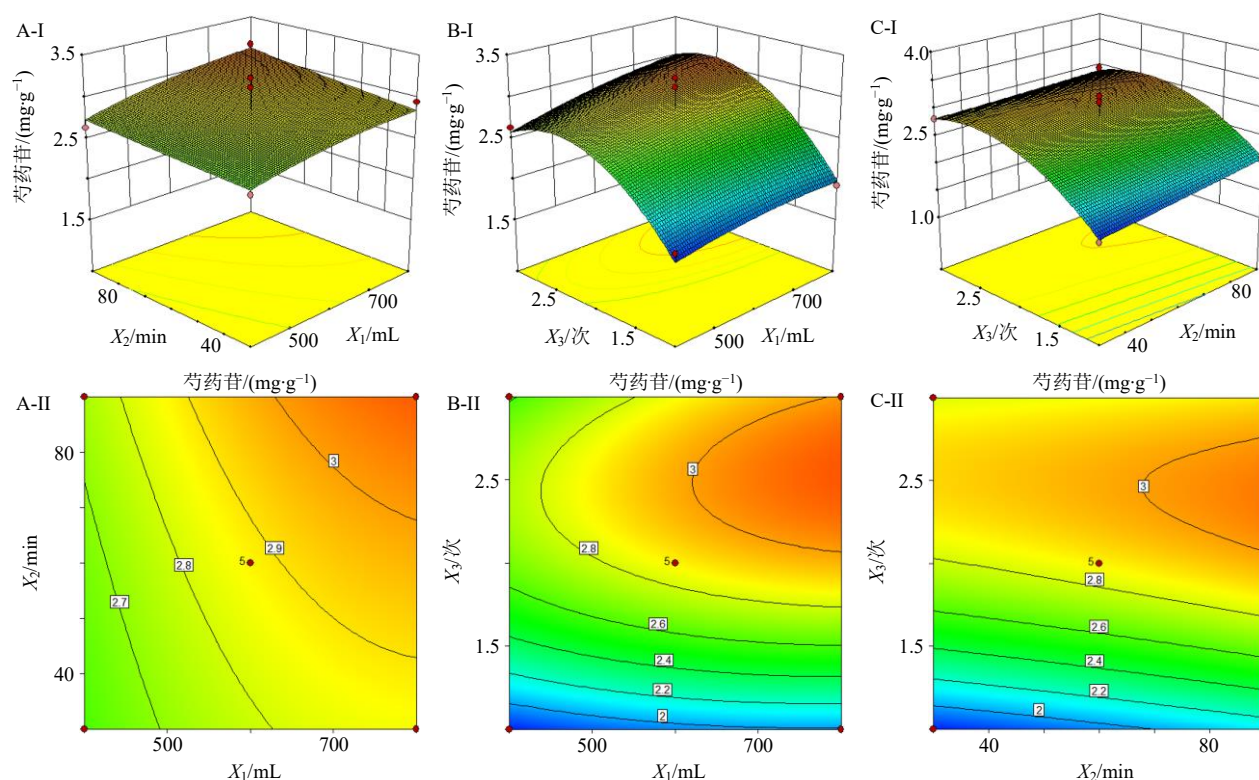


图 5 芍药苷的响应面 (I) 及等高线 (II)

Fig. 5 Response surface figure (I) and contour analysis (II) of content of paeoniflorin

度高于加水量, 即提取次数对芍药苷影响较大; 图 5-C 表示提取次数和提取时间对芍药苷的影响, 当加水量固定为 600 mL 时, 提取次数的等高线密度高于提取时间, 即各因素对芍药苷的影响为提取次数 > 加水量 > 提取时间。图 5-B、C 响应面坡度较陡, 表示提取次数与加水量、提取次数与提取时间之间交互作用较强, 对芍药苷影响大。

阿魏酸的等高线及响应面分析见图 6, 其中图 6-A 表示提取时间和加水量对阿魏酸的影响。当提取次数固定为 2.24 次时, 提取时间等高线密度高于加水量, 即提取时间对阿魏酸影响较大; 图 6-B 表示提取次数和加水量对阿魏酸的影响, 当提取时间固定为 60 min 时, 提取次数的等高线密度高于加水量, 即提取次数对阿魏酸影响较大; 图 6-C 表示提取次数和提取时间对阿魏酸的影响, 当加水量固定为 600 mL 时, 提取次数的等高线密度高于提取时间, 即各因素对阿魏酸的影响为提取次数 > 提取时间 > 加水量。图 6-B、C 的响应面较陡, 表明提取次数与加水量、提取次数与提取时间之间交互作用较强, 对阿魏酸影响较大。

HSYA 的等高线及响应面分析见图 7, 其中图 7-A 表示提取时间和加水量对 HSYA 的影响。当提

取次数固定为 2 次时, 提取时间等高线密度高于加水量, 即提取时间对 HSYA 影响较大; 图 7-B 表示提取次数和加水量对 HSYA 的影响, 当提取时间固定为 60 min 时, 提取次数的等高线密度高于加水量, 即提取次数对 HSYA 影响较大; 图 7-C 表示提取次数和提取时间对 HSYA 的影响, 当加水量固定为 600 mL 时, 提取次数的等高线密度高于提取时间, 即各因素对 HSYA 的影响为提取次数 > 提取时间 > 加水量。图 7-B、C 响应面坡度较陡, 表示提取次数与加水量、提取次数与提取时间之间交互作用较强, 对 HSYA 有较大的影响。

出膏率的等高线及响应面分析见图 8, 其中图 8-A 表示提取时间和加水量对出膏率的影响。当提取次数固定为 2 次时, 加水量等高线密度高于提取时间, 即加水量对出膏率影响较大; 图 8-B 表示提取次数和加水量对出膏率的影响, 当提取时间固定为 60 min 时, 提取次数的等高线密度高于加水量, 即提取次数对出膏率影响较大; 图 8-C 表示提取次数和提取时间对出膏率的影响, 当加水量固定为 600 mL 时, 提取次数的等高线密度高于提取时间, 即各因素对出膏率的影响为提取次数 > 加水量 > 提取时间。图 8-A、C 响应面坡度较陡, 表示提取时

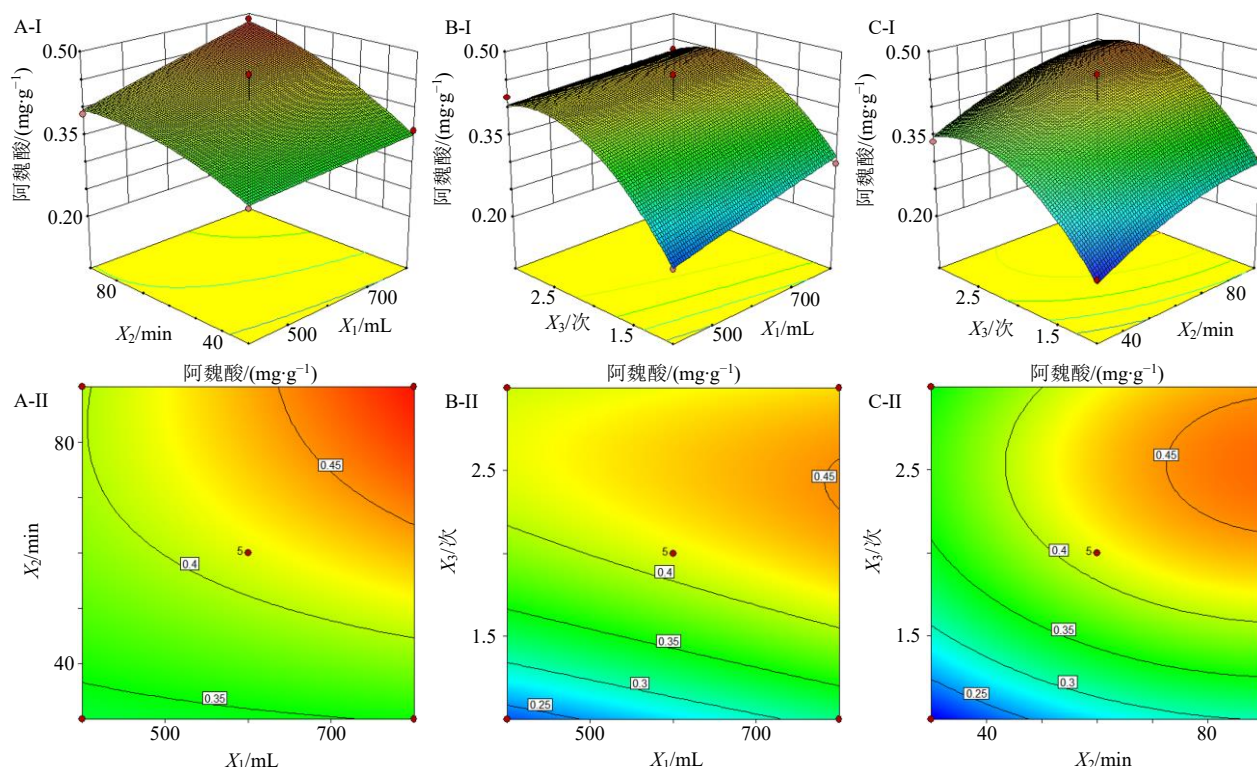


图 6 阿魏酸的响应面 (I) 及等高线 (II)

Fig. 6 Response surface figure (I) and contour analysis (II) of content of ferulic acid

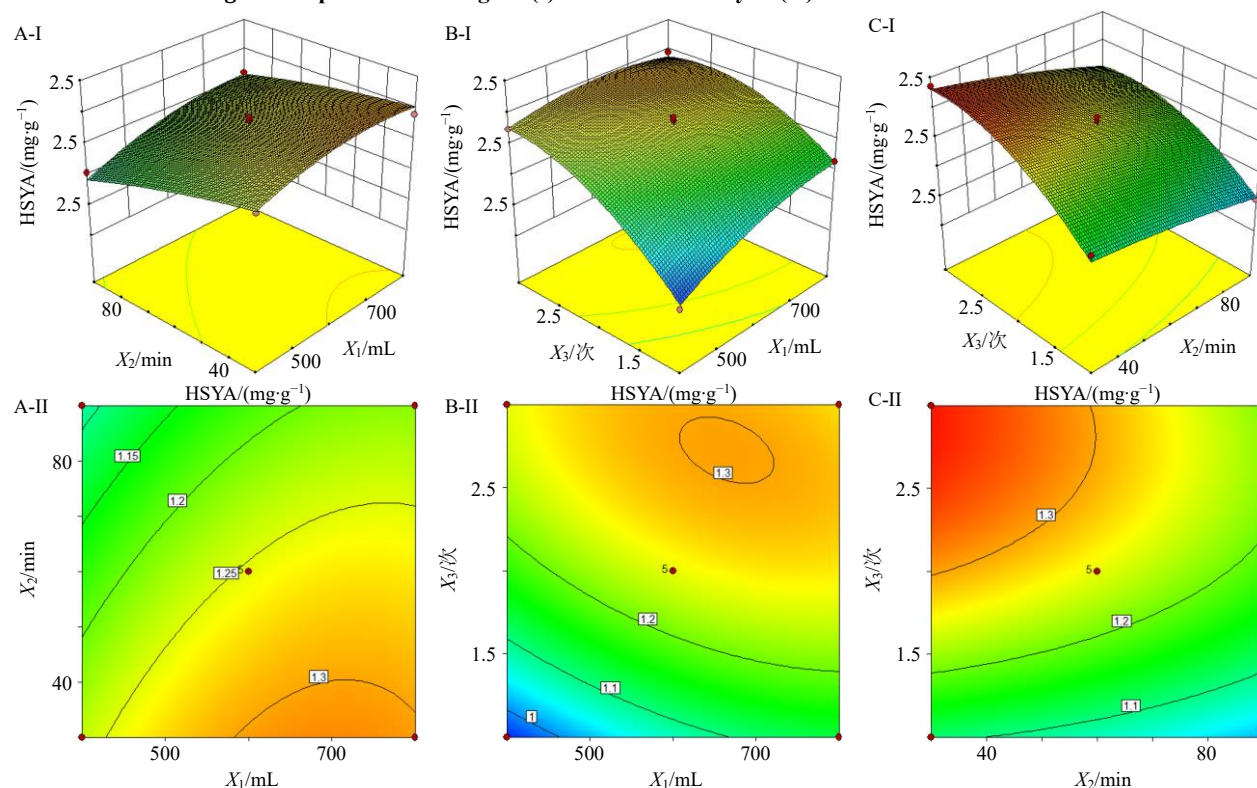


图 7 HSYA 的响应面 (I) 及等高线 (II)

Fig. 7 Response surface figure (I) and contour analysis (II) of content of HSYA

间与加水量、提取次数与提取时间之间交互作用较强, 对出膏率有较大的影响。

运用 Design-Expert 10 软件优化所得的 TSD 提取最佳工艺的预测值为加水量 654.721 mL, 提取时

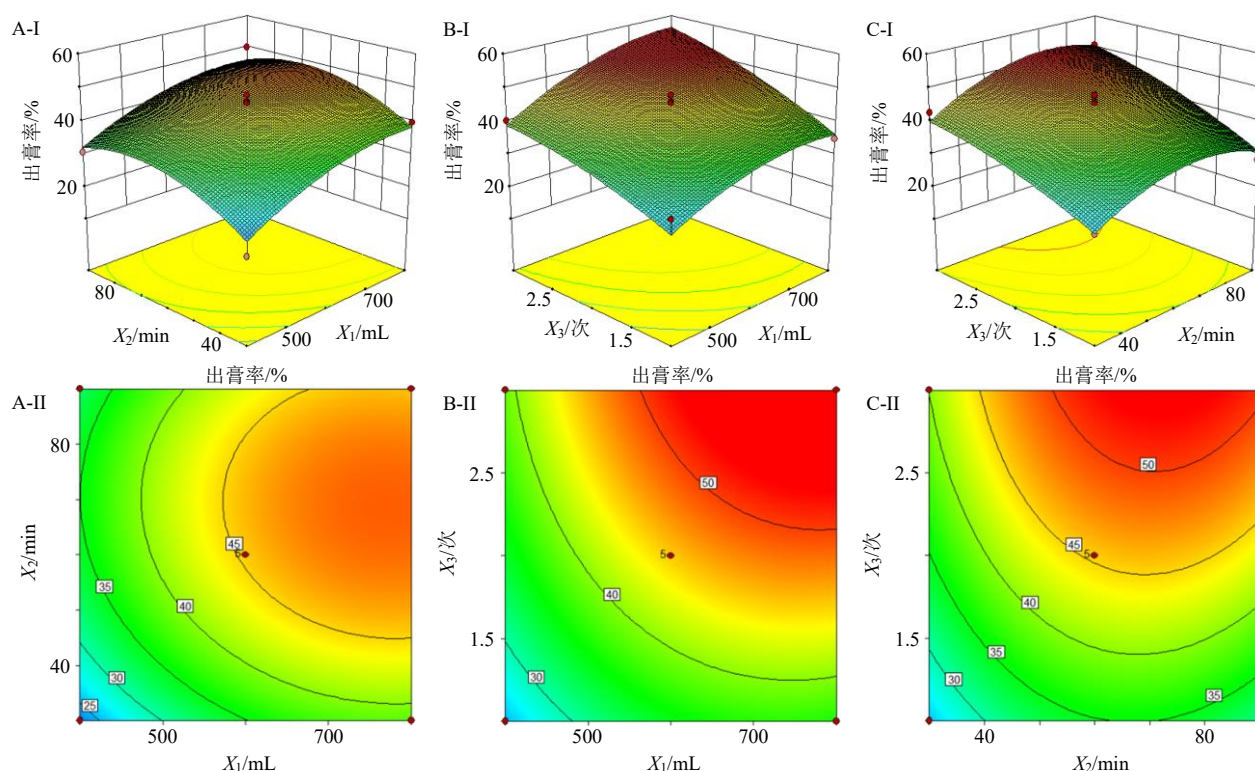


图 8 出膏率的响应面 (I) 及等高线 (II)

Fig. 8 Response surface figure (I) and contour analysis (II) of content of extract rate

间 51.082 min, 提取次数 2.442 次, 在此条件下芍药苷提取率为 3.003 mg/g, 阿魏酸提取率为 0.420 mg/g, HSYA 提取率为 1.314 mg/g, 出膏率为 48.66%。响应面实验中所提取条件实际最优值为加水量 600 mL, 提取时间 60 min, 提取次数 2 次。

2.6.6 设计空间的建立 由于工业生产最佳提取条件具有一定的局限性, 故根据响应面中各因素对指标的影响, 设定目标范围, 建立设计空间, 为工业生产确定提取条件范围, 以满足生产的实际需要。前期研究表明, 该批次基准样品中芍药苷质量分数为 2.10 mg/g, 阿魏酸质量分数为 0.34 mg/g, HSYA 质量分数为 1.15 mg/g, 出膏率为 37.43%, 且水提液经浓缩干燥后, 芍药苷损失率约为 15%, 阿魏酸、HSYA 损失率分别约为 30%。为保证得到的制剂中间体在基准样品 70%~130%, 设定优化目标 [根据《按古代经典名方目录管理的中药复方制剂药学研究技术指导原则 (试行)》, 应从指标性成分、出膏率等方面说明制剂质量与基准样品质量的一致性, 因此设置颗粒剂定量检测指标在基准样品的 70%~130%。由于本实验是实验室小试, 与药厂沟通后结合实际情况, 认为中试放大生产中指标成分损失率会高于实验室小试的损失率, 为保证中试所得颗粒

剂的成分含量满足要求, 因此将 3 个指标性成分上限确定为基准样品中该成分含量 $\times$ (130%+成分损失率), 下限确定为基准样品中相应成分含量]为芍药苷 2.10~3.05 mg/g, 阿魏酸 0.34~0.54 mg/g, HSYA 为 1.15~1.84 mg/g, 出膏率 37.43%~48.66%。以此为条件搜索符合目标的子集, 构建设计空间, 结果见图 9-A。图中黑色区域为满足条件的提取工艺, 由于模型的预测值与真实值存在一定差异, 使设计空间的边界具有不确定性, 因此在定义设计空间时加入置信水平 $\alpha=0.05$, 对设计空间进行优化, 结果见图 9-B。图中黑色区域为置信度 95% 的控制空间, 空间内所有点的估计值均符合工艺目标, 灰色区域为风险区域, 即此空间内的估计值有 5% 的概率无法满足原有的工艺目标要求, 白色区域不能达到优化目标。

2.6.7 控制空间的验证 为验证响应面法所得结果的可靠性, 选取设计空间内 4 个不同的点进行验证, 实验条件的选取见表 5。验证实验结果见表 6, 结果表明, 空间内的点符合要求, 而空间外的点不满足, 表明所建立的空间能够满足目标。验证实验所得制剂中间体的指标性成分含量均在基准样品的 70%~130%, 与基准样品质量属性接近, 表明所确定的提

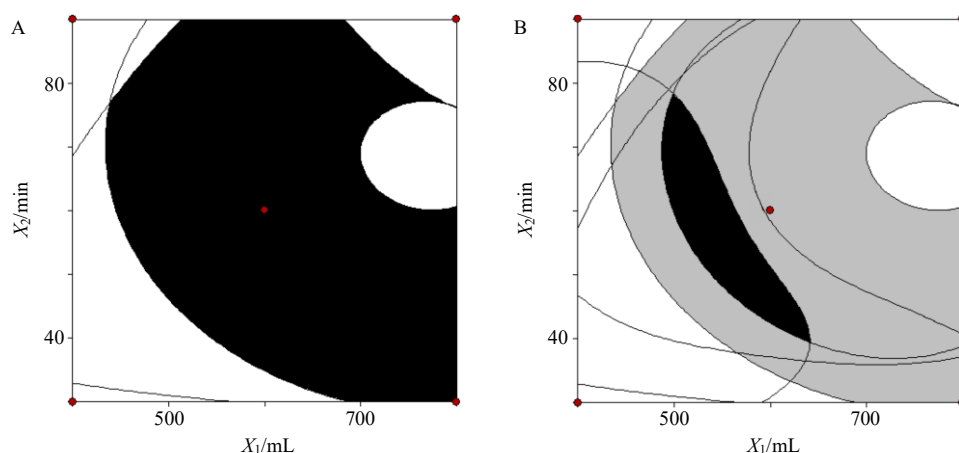


图 9 TSD 提取工艺设计空间

Fig. 9 Design space of extract process of TSD

表 5 验证试验点的选取

Table 5 Selection of experimental verification points

验证批次	加水量/mL	提取时间/min
1 (空间内)	550	60
2 (空间内)	600	50
3 (空间外)	420	30
4 (置信区间)	600	60

提取次数均为 2 次
the extraction times are 2 times

取工艺稳定可行。

3 讨论

《古代经典名方中药复方制剂及其物质基准的申报资料要求(试行)》指出,应从出膏率/浸出物、指纹/特征图谱、指标成分含量及转移率等方面,说明制剂与基准样品的一致性。前期研究表明,15 批基准样品的指纹图谱相似度均大于 0.9,故不将其作为评价指标。芍药苷为白芍中的主要药效成分,阿魏酸为当归、川芎中的药效成分,HSYA 为红花中

表 6 验证试验结果 (n=3)

Table 6 Results of verification test (n=3)

验证批次	芍药苷/(mg·g ⁻¹)	阿魏酸/(mg·g ⁻¹)	HSYA/(mg·g ⁻¹)	出膏率/%
1 (空间内)	3.06±0.02	0.48±0.01	1.26±0.01	45.83±1.50
2 (空间内)	3.01±0.03	0.43±0.01	1.33±0.03	46.74±0.83
3 (空间外)	2.55±0.02	0.34±0.01	1.18±0.03	36.65±0.08
4 (置信区间)	2.65±0.02	0.41±0.01	1.23±0.01	45.54±0.29
基准样品	2.10±0.03	0.34±0.01	1.15±0.01	37.43±0.43
制剂中间体	2.53±0.10	0.30±0.01	0.58±0.50	49.48±1.50

的药效成分^[11-12],三者均为质量考察指标成分,也是 TSD 发挥抗炎、镇痛作用的关键成分^[13-15]。出膏率也是提取液的重要评价指标,因此选择芍药苷、阿魏酸、HSYA 及出膏率作为评价指标。

响应面法是整合实验设计和数学建模的优化方法,可有效减少试验次数,目前已被广泛应用于中药提取及制剂制备中^[16-20]。它可将各指标设定在一定范围内,为设计空间的选择提供依据,而设计空间的建立能够有效优化实验条件,为工业生产提供可控范围。本实验前期确定各指标成分经浓缩干燥

后的损失率,并将其加入设计空间工艺优化目标条件中,以使制剂中间体与基准样品质量属性接近。

通过建立设计空间,结合实际确定最佳提取工艺范围为提取次数 2 次,加水量为 11~15 倍,提取时间为 40~80 min。所得制剂中间体的指标性成分含量与基准样品含量相近,转移率在 70%~130%,说明应用响应面优化法得到的 TSD 提取工艺稳定,所得制剂中间体与基准样品质量属性基本一致,可以作为后续颗粒剂的提取方法。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 于峥注. 妇科冰鉴 [M]. 北京: 人民军医出版社, 2012: 5.
- [2] 张东龙. 桃红四物汤临床应用研究进展 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2014, 16(11): 217-219.
- [3] 徐志红, 陈磊垚, 许立, 等. 桃红四物汤治疗骨质疏松症的药效学研究 [J]. 中草药, 2021, 52(18): 5608-5614.
- [4] Zhang Y Y, Wang J C, Zuo C J, *et al.* Protective effect of Taohong Siwu Decoction on abnormal uterine bleeding induced by incomplete medical abortion in rats during early pregnancy [J]. *Chem Pharm Bull*, 2018, 66(7): 708-713.
- [5] 连传运, 徐冰, 王秋平, 等. 中药质量源于设计应用: 工艺控制策略 [J]. 世界中医药, 2018, 13(3): 561-565.
- [6] 何云华, 石红霞, 刁本恕, 等. 基于质量源于设计理念的山参饮提取工艺研究 [J]. 中国药业, 2020, 29(15): 28-32.
- [7] 李双双, 郭春燕. 桃红四物汤化学成分及药理作用研究进展 [J]. 神经药理学报, 2016, 6(4): 42-49.
- [8] 聂欣, 成颜芬, 王琳, 等. 桃红四物汤化学成分、药理作用、临床应用的研究进展及质量标志物的预测分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(4): 226-234.
- [9] 黄兴国, 张静, 杜文慧, 等. QbD 理念的经典名方研究: 四物汤加减方的提取工艺优化研究 [J]. 中国中药杂志, 2019, 44(20): 4329-4335.
- [10] 何瑶, 江华娟, 成颜芬, 等. 基于 Box-Behnken 设计-响应面法与质量综合评价优化经典名方桃红四物汤煎煮工艺 [J]. 中草药, 2021, 52(22): 6845-6855.
- [11] 吴振华. 中药红花研究进展的概述 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2019, 19(34): 33-34.
- [12] 陈梦, 赵丕文, 孙艳玲, 等. 红花及其主要成分的药理作用研究进展 [J]. 环球中医药, 2012, 5(7): 556-560.
- [13] 江华娟, 李敏敏, 何瑶, 等. 基于 HPLC 指纹图谱和化学模式识别的经典名方桃红四物汤制备过程质量评价研究 [J]. 中草药, 2021, 52(4): 1000-1010.
- [14] 成颜芬, 江华娟, 王琳, 等. 经典名方桃红四物汤化学指纹图谱及 9 种成分含量测定研究 [J]. 中草药, 2020, 51(3): 653-661.
- [15] 王俪桦, 应泽茜, 孙贝贝, 等. 基于 Box-Behnken 设计-响应面法优化蜜麦麸的制备工艺 [J]. 中草药, 2021, 52(12): 3538-3543.
- [16] 曾海蓉, 李婷娜, 冉倩, 等. 基于熵权法结合 Box-Behnken 响应面法优化桂枝芍药知母颗粒复方提取工艺 [J]. 中草药, 2020, 51(1): 84-90.
- [17] 王永洁, 陈桢, 邓莉莉, 等. 基于质量源于设计理念的红花颗粒制备工艺及物理指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2019, 50(17): 4123-4130.
- [18] 冯媛, 郑玉光, 刘岩, 等. Box-Behnken 响应面法优化关黄柏药材中生物碱提取工艺 [J]. 中国药业, 2021, 30(22): 61-65.
- [19] 王星星, 张艳军, 朱秀辉, 等. 基于质量源于设计理念优化参蒲盆炎颗粒喷雾干燥工艺 [J]. 中草药, 2019, 50(6): 1334-1340.
- [20] 张俊鸿, 何雁, 许燕, 等. 基于质量源于设计理念的风咳颗粒喷雾干燥工艺研究 [J]. 中草药, 2017, 48(10): 2061-2066.

[责任编辑 郑礼胜]