

基于设计空间法优化北刘寄奴-骨碎补的提取工艺研究

张 梅¹, 况 刚², 张有金³, 雷燕莉⁴, 谭瑶琳⁵, 余志晴⁴, 段思洋⁴, 刘 涛^{1,6*}

1. 成都大学食品与生物工程学院, 四川 成都 610106

2. 重庆第二师范学院生物与化学工程学院, 重庆 400047

3. 成都大学临床医学院, 四川 成都 610081

4. 成都大学药学院, 四川 成都 610106

5. 广西中医药大学药学院, 广西 南宁 530200

6. 四川省抗病毒中药产业化工程技术研究中心, 四川 成都 610106

摘要: **目的** 采用网络药理学和设计空间法优化北刘寄奴-骨碎补的提取工艺, 确定其提取工艺参数范围, 提高原药材利用率, 减少能源损耗, 以达到减少碳排放量和保护环境的目的。 **方法** 利用网络药理学方法筛选出活性成分, 同时结合《中国药典》2020 年版一部相关北刘寄奴、骨碎补项下确定柚皮苷、木犀草素为指标性成分, 采用 Minitab 17 软件进行 Plackett-Burman 实验设计, 初步确定提取次数、提取时间以及加溶媒倍数为关键工艺参数 (critical process parameters, CPP), 通过软件 Design-Expert 10 进行 Box-Behnken 3 因素 3 水平实验设计, 建立关键质量属性 (critical quality attribute, CQA) 和 CPP 间的数学模型, 最后通过 Monte Carlo 法计算获得基于概率的设计空间, 并对点内、点外进行验证。 **结果** 确定最佳提取工艺为乙醇体积分数 45%, 提取次数 3 次, 每次提取时间 2~3 h, 加溶媒倍数为 11~15 倍。 **结论** 运用设计空间法优化北刘寄奴-骨碎补提取工艺所得到的理论值与预测值结果接近, 表明该法稳定可靠, 可避免常规设计方法潜在的过度提取弊端, 在大生产中可以节约资源和减少碳排放。

关键词: 网络药理学; 设计空间法; 北刘寄奴; 骨碎补; 柚皮苷; 木犀草素; Plackett-Burman 实验设计; 关键工艺参数; 关键质量参数; Monte Carlo 法

中图分类号: R284.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)08-2341-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.08.010

Optimization of extraction technology of *Siphonostegiae Herba-Drynariae Rhizoma* based on design space method

ZHANG Mei¹, KUANG Gang², ZHANG You-jin³, LEI Yan-li⁴, TAN Yao-lin⁵, YU Zhi-qing⁴, DUAN Si-yang⁴, LIU Tao^{1,6}

1. School of Food and Bioengineering, Chengdu University, Chengdu 610106, China

2. School of Biological and Chemical Engineering, Chongqing Second Normal University, Chongqing 400047, China

3. Clinical Medical College, Chengdu University, Chengdu 610081, China

4. College of Pharmacy, Chengdu University, Chengdu 610106, China

5. School of Pharmacy, Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning 530200, China

6. Sichuan Provincial Engineering Research Center for Antiviral Chinese Medicine Industrialization, Chengdu 610106, China

Abstract: Objective To optimize the extraction process of Beiliujin (*Siphonostegiae Herba*, SH)-Gushibu (*Drynariae Rhizoma*, DR) by network pharmacology and design space method, determine the range of extraction process parameters, improve the utilization rate of raw medicinal materials and reduce energy consumption, so as to reduce carbon emissions and protect the environment. **Methods** The active components were screened by network pharmacology, and naringin and luteolin were

收稿日期: 2021-10-30

基金项目: 四川省科技创新苗子工程资助项目 (2021054); 2021 年四川省大学生创业训练计划项目 (S202111079126X); 2021 年四川省大学生创新训练计划项目 (S202111079087); 四川省 2021—2023 年高等教育人才培养质量和教学改革项目 (JG2021-1106)

作者简介: 张 梅 (2001—), 在读本科生, 研究方向为中药新药开发研究。Tel: 18381355193 E-mail: 2523016935@qq.com

*通信作者: 刘 涛 (1976—), 博士, 教授, 主要从事中成药新药开发及再评价工作。Tel: 13378118375 E-mail: liutao0578@sina.com

determined as the index components under the relevant items of “Chinese Pharmacopoeia” 2020 edition. The Plackett-Burman experimental design was carried out by Minitab 17 software. The extraction times, extraction time and solvent multiple were preliminarily determined as the critical process parameters (CPP). The Box-Behnken three-factor three-level experimental design was carried out by software Design-Expert 10, and the mathematical model between the critical quality attribute (CQA) and CPP was established. Finally, the probability-based design space was obtained by Monte Carlo method, and the interior and exterior points were verified. **Results** The optimal extraction process was determined as follows: ethanol concentration 45%, extraction three times, extraction time 2—3 h each time, and solvent multiple 11—15 times. **Conclusion** The verification results show that the theoretical value obtained by using the design space method to optimize the extraction process of SH-DR is close to the predicted value, indicating that the method is stable and reliable, which can avoid the potential excessive extraction drawbacks of conventional design methods, and can save resources and reduce carbon emissions in mass production.

Key words: network pharmacology; design space method; *Siphonostegiae Herba*; *Drynariae Rhizoma*; naringin; luteolin; Plackett-Burman experimental design; critical process parameters; critical quality attribute; Monte Carlo method

强直性脊柱炎 (ankylosing spondylitis, AS) 主要是脊柱产生病变, 累及骶髂关节, 引起脊柱纤维化和强直的自身免疫疾病^[1-2]。国内强直性脊柱炎患者多发群体集中于青壮年, 发病率为 0.3% 左右^[3-4], 且男性较女性易发, 发病率是女性的 3 倍左右^[5]。大多数医家认为 AS 的病因病机为肾督亏虚^[6], 临床研究也表明 AS 早期为骨代谢异常导致骨质炎症, 阎小萍等^[7]认为可通过增强骨密度、提高骨代谢, 以降低脊柱至畸概率。因此, 早期监控骨代谢变化、预防骨折及骨质疏松发生显得尤为重要。现已有相关实验表明, 可以通过抑制基质金属蛋白酶 2 (matrix metalloproteinase 2, MMP-2)、MMP-9、组织因子 (tissue factor, TF)、Rho 相关卷曲螺旋形成蛋白激酶 1 (Rho associated coiled coil forming protein kinase 1, ROCK1) 等 AS 相关基因介导的血管平滑肌细胞增殖, 从而抑制 AS 病变蔓延至其他部位^[8-11]。

骨碎补为水龙骨科槲蕨属植物槲蕨 *Drynaria fortunei* (Kunze) J. Sm. 的干燥根茎, 性温, 味苦, 归肝肾二经, 有疗伤止痛、补肾强骨、益督活血的功效^[12], 现代药理研究表明, 骨碎补有增加成骨细胞增殖分化、抑制破骨细胞性骨吸收、改善骨代谢以及促使骨髓间充质干细胞成骨分化作用, 临床常用于抗骨质疏松症和促进骨折愈合^[13], 目前已有骨碎补总黄酮胶囊上市销售。北刘寄奴为玄参科阴行草属植物阴行草 *Siphonostegia chinensis* Benth. 的干燥全草, 性寒, 味苦, 归脾、胃、肝、胆经, 中医药理论认为腰为肾之府, 腰病变至肾督亏虚, AS 早期肝血不足者筋得不到濡养, 有腰背疼痛之状, 直至僵硬, 严重者使脊柱和外周关节产生病变^[14-15]。本课题组前期研究表明北刘寄奴、骨碎补进行配伍

用于治疗 AS 有较好的疗效。

设计空间法建立的设计空间中中药材工艺参数在一定范围内波动, 徐冰等^[16]认为药品生产工艺参数在设计空间内则可无需再进行申报, 可提高药品监管的灵活性, 节约大量人力、财力以及物力。中药提取工艺是中药制造业中至关重要的一步, 传统固定工艺参数模式进行提取往往要消耗大量溶剂和热能。一些药物在前期上市研究时, 其工艺参数确定的指标可能与药物活性无关, 因此, 目前国家鼓励对复方制剂的制备工艺进行持续评价与改进。而质量源于设计 (quality by design, QbD) 理念则主要是对中药材的关键质量属性 (critical quality attribute, CQA) 和工艺参数 (critical process parameters, CPP) 进行研究, 并以药物活性成分为指标, 确定工艺参数范围, 保证产品质量在可靠工艺范围内运行, 减少生产中批次不合格问题, 从而有力的保证产品质量, 可达到降低能源消耗, 达到“低碳”目的。

1 仪器与材料

1.1 仪器

SQP 电子天平, 奥多利斯科学仪器有限公司; FA-2004 分析电子天平, 上海良平仪器仪表有限公司; BT-6000 分析电子天平, 上海友声衡器有限公司; HH-6 数显恒温水浴锅, 常州朗越仪器制造有限公司; 800Y 型高速多功能粉碎, 永机康市铂欧五金制品有限公司; PS-40 超声波清洗器, 深圳得康清洗设备有限公司; SHB-III 循环水式多用真空泵, 北京科伟永兴仪器有限公司; OH6-903385-III 电热鼓风干燥箱, 上海新苗医疗器械制造有限公司; ZDHW 调温电热套, 北京中兴伟业世纪仪器有限公司; Eclassical 3200 高效液相色谱仪, 大连依利特分析仪器有限公司。

1.2 材料

北刘寄奴(批号 210425)、骨碎补(批号 210425)均购自四川省成都市荷花池中药材市场,经成都大学食品与生物工程学院刘涛教授鉴定,分别为玄参科阴行草属植物阴行草 *S. chinensis* Benth. 的干燥全草、水龙骨科槲蕨属植物槲蕨 *D. fortunei* (Kunze) J. Sm. 的干燥根茎;对照品柚皮苷(批号 wkq21020606)、木犀草素(批号 wkq21040905),质量分数均 $\geq 98\%$,均购自四川省维克奇生物科技有限公司;用于液相分析的甲醇、乙腈为色谱级,质量分数均 $\geq 99.9\%$,磷酸(批号 2019010201)、冰乙酸(批号 2020123001)、95%乙醇(批号 2020040901)、甲醇(批号 2020040902)为分析级,均购自成都市科隆化学品有限公司;怡宝纯净水,华润怡宝饮料(中国)有限公司。

2 方法与结果

2.1 药物活性成分筛选

为确定提取工艺指标成分与临床疗效相关,采用中药系统药理学数据库与分析平台(traditional Chinese medicine systems pharmacology database and analysis platform, TCMSP)分别以北刘寄奴、骨碎补为关键词检索,以口服生物利用度(oral bioavailability, OB) $\geq 30\%$ 、类药性(drug likeness, DL) ≥ 0.18 为筛选条件,得到两者活性成分,并对活性成分的相关靶标进行搜集^[17-20]。

以“ankylosing spondylitis”为关键词,利用 Uniprot 数据库、GengCards 数据库以及结合 Venny 2.1.0 在线工作站得到 MMP2、MMP9、白细胞介素 6(interleukin 6, IL-6)、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)、IL-4 等 48 个药物-疾病交集基因。将 STRING 软件分析结果导入 Cytoscape 3.7.2 软件数据进行可视化分析,构建成分-靶点基因互作网络图^[21-25](图 1),根据网络拓扑参数分析筛选出的重要节点多来源于木犀草素(MOL000006)和柚皮苷(MOL004328),再结合《中国药典》2020 年版一部相关北刘寄奴、骨碎补项下最终确定柚皮苷、木犀草素为后续研究中的指标性成分,文献研究也表明,这 2 种成分具有治疗强直性脊柱炎的作用^[26-27]。

2.2 活性成分柚皮苷、木犀草素的测定

2.2.1 对照品溶液制备 取柚皮苷、木犀草素对照品适量,精密称定,加甲醇制成含柚皮苷 70.0 $\mu\text{g/mL}$ 、木犀草素 70.6 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液制备 取“1.2”项下 2 味中药饮

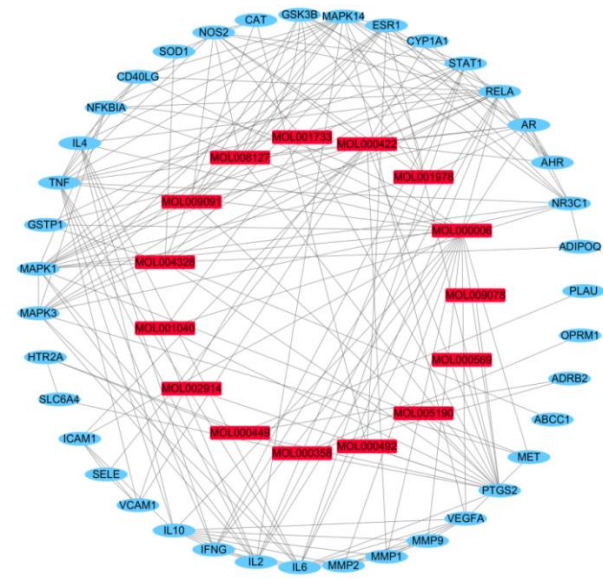


图 1 成分-靶点基因互作网络图

Fig. 1 Component-target gene interaction network diagram

片(配伍比例 1:1)适量(各 25 g),加 11.5 倍体积分数为 45%乙醇,提取 1 次,提取 1 h,滤过,待冷却至室温,抽滤,量取总体积,取适量滤液经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,作为供试品溶液。

2.2.3 色谱条件^[28-29] 采用 Supersil ODS 色谱柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm);体积流量为 1 mL/min;柱温 30 $^{\circ}\text{C}$;进样量为 10 μL ;检测波长 270 nm;以乙腈-0.1%冰乙酸水溶液为流动相,梯度洗脱:0~15 min, 15%~33%乙腈;15~25 min, 33%~51%乙腈;25~30 min, 51%~15%乙腈;30~35 min, 15%~15%乙腈。

2.2.4 专属性试验 精密移取“2.2.1”项下混合对照品溶液和“2.2.2”项下供试品溶液各 10 μL ,按“2.2.3”项下色谱条件进行含量测定,结果表明供试品色谱峰与对照品色谱峰的保留时间一致对应。色谱图见图 2。

2.2.5 线性关系考察 取“2.2.1”项下混合对照品

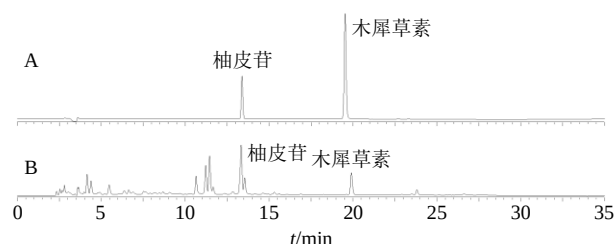


图 2 混合对照品 (A) 和北刘寄奴-骨碎补供试品 (B) 的 HPLC 图

Fig. 2 HPLC of mixed reference substances (A) and SH-DR test substance (B)

溶液,用甲醇稀释成不同质量浓度的系列混合对照品溶液,按“2.2.3”项下色谱条件进行测定,以混合对照品质量浓度为横坐标(X),峰面积为纵坐标(Y),进行线性回归,得到柚皮苷回归方程 $Y=10\,307X+9\,162.6$, $r=0.999\,9$,线性范围 $4.375\sim70.000\,\mu\text{g/mL}$;木犀草素回归方程 $Y=34\,051X+12\,810$, $r=0.999\,7$,线性范围 $4.4\sim70.4\,\mu\text{g/mL}$;结果表明,柚皮苷、木犀草素在各自线性范围内线性关系良好。

2.2.6 精密度试验 精密移取“2.2.1”项下对照品溶液 $10\,\mu\text{L}$,按“2.2.3”项下色谱条件,连续进样测定6次,记录峰面积,计算柚皮苷、木犀草素的峰面积的RSD分别为2.93%、2.13%,结果表明仪器精密度良好。

2.2.7 稳定性试验 精密称取“1.2”项下北刘寄奴、骨碎补适量,依“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,分别在0、2、4、8、12、16、20、24 h后分别进样 $10\,\mu\text{L}$,按“2.2.3”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果表明,柚皮苷、木犀草素峰面积的RSD分别为2.15%、4.86%,即供试品溶液在室温下放置24 h基本稳定。

2.2.8 重复性试验 精密称取“1.2”项下北刘寄奴、骨碎补6份,依“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.2.3”项下色谱条件进样测定,记录柚皮苷、木犀草素峰面积并计算其含量。结果表明柚皮苷、木犀草素质量分数的RSD分别为4.76%、4.38%,表明该色谱条件下测定重复性良好。

2.2.9 加样回收率试验 精密移取已测定柚皮苷、木犀草素含量的北刘寄奴骨碎补各 $12.5\,\text{g}$,分别添加药材中等量的柚皮苷和木犀草素的对照品溶液,依“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,平行制备6份,按“2.2.3”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。计算得柚皮苷、木犀草素的平均回收率分别为94.23%、96.31%,RSD分别为2.36%、3.41%。

2.2.10 样品测定 将“2.2.2”项下制备的供试品溶液按“2.2.3”项下色谱条件进行测定。

2.3 干膏率测定

精密量取北刘寄奴-骨碎补提取液 $50\,\text{mL}$,置于已恒定质量的蒸发皿中,水浴蒸干,于 $105\,^{\circ}\text{C}$ 烘箱中干燥3 h,在干燥器中冷却30 min,迅速称定质量,计算干膏率。

$$\text{干膏率} = mV/50M$$

m 表示 $50\,\text{mL}$ 提取液的干膏质量, V 表示总提取液体积, M 表示生药材质量

2.4 CPP和CQA的确定

对北刘寄奴-骨碎补提取过程中提取次数(X_1)、提取时间(X_2)、加溶媒倍数(X_3)以及乙醇体积分数(X_4)进行筛选和风险评估,将柚皮苷提取量(Y_1)、木犀草素提取量(Y_2)以及干膏率(Y_3)作为北刘寄奴-骨碎补中间体制备工艺的CQA。

2.4.1 单因素实验 取“1.2”项下2味中药饮片适量,分别加入10倍量水及45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%乙醇,提取2次,每次提取 $1\,\text{h}$ ^[30-33],滤过,合并2次滤液,待冷却至室温,抽滤,量取总体积,取适量滤液经 $0.45\,\mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过,作为供试品溶液。综合评分结果见表1,可知用体积分数为45%乙醇进行提取各项指标较好。

综合评分=干膏率/最大干膏率 $\times 20$ +木犀草素量/最大木犀草素量 $\times 40$ +柚皮苷量/最大柚皮苷量 $\times 40$

表1 溶媒筛选结果表

Table 1 Solvent screening results table

试验号	X_1 /次	X_2 /h	X_3 /倍	X_4 /%	Y_1 /mg	Y_2 /mg	Y_3 /%	综合评分
1	1	2	10	0	75.60	0.19	8.75	38.00
2	1	2	10	45	170.19	22.26	8.78	95.60
3	1	2	10	50	112.50	14.76	7.68	67.54
4	1	2	10	55	122.80	21.26	7.96	81.00
5	1	2	10	60	6.04	20.63	8.11	52.89
6	1	2	10	65	95.49	23.97	7.76	78.46
7	1	2	10	70	154.65	25.01	7.70	93.89
8	1	2	10	75	138.54	21.15	7.26	82.93

2.4.2 CPP确定 利用Minitab 17软件对提取次数(X_1)、提取时间(X_2)、加溶媒倍数(X_3)以及乙醇体积分数(X_4)进行Plackett-Burman实验设计,Plackett-Burman实验设计与结果见表2。

分别以 $Y_1\sim Y_3$ 对 $X_1\sim X_4$ 进行线性回归,得回归方程 $Y_1=-14.5+25.00X_1+19.18X_2+2.14X_3+0.089X_4$; $Y_2=-4.39+3.43X_1+0.97X_2+0.845X_3+0.004X_4$; $Y_3=0.014\,5+0.020\,43X_1+0.011\,47X_2+1.633\times 10^{-3}X_3-2.15\times 10^{-4}X_4$ 。方差分析见表3,由表3可知 $Y_1\sim Y_3$ 均对 $X_1\sim X_2$ 或 X_3 显著,标准化效应的pareto图见图3,由图3可知效应值影响较大的工艺参数分别为 X_1 、 X_2 、 X_3 。结合方差分析和pareto图最终确定提取次数 X_1 、提取时间 X_2 、加溶媒倍数 X_3 作为本研究中的关键工艺参数。

2.4.3 Box-Behnken实验设计 为考察提取次数(X_1)、提取时间(X_2)、加溶媒倍数(X_3)对北刘寄奴-骨碎补提取工艺的影响规律,利用软件Design-Expert

表 2 Plackett-Burman 实验设计与结果

Table 2 Plackett-Burman experimental design and results

试验号	X ₁ /次	X ₂ /h	X ₃ /倍	X ₄ /%	Y ₁ /mg	Y ₂ /mg	Y ₃ /%	试验号	X ₁ /次	X ₂ /h	X ₃ /倍	X ₄ /%	Y ₁ /mg	Y ₂ /mg	Y ₃ /%
1	1	3	15	60	116.23	16.28	8.55	7	3	3	15	40	149.73	21.37	12.75
2	1	1	8	40	56.88	4.40	5.09	8	3	1	8	40	99.66	14.77	9.51
3	3	3	8	60	159.72	14.10	11.90	9	1	3	15	40	82.77	12.36	7.70
4	1	1	15	60	89.19	16.65	7.02	10	3	1	8	60	91.44	12.62	8.28
5	1	3	8	40	90.12	8.42	7.11	11	1	1	8	60	32.29	7.25	4.09
6	3	1	15	40	132.96	24.42	10.95	12	3	3	8	60	133.97	19.28	10.69

表 3 方差分析

Table 3 Analysis of variance

误差来源	自由度	Y ₁				Y ₂				Y ₃			
		离均方平均和	均方	F 值	P 值	离均方平均和	均方	F 值	P 值	离均方平均和	均方	F 值	P 值
模型	4	12 592.700	3 148.180	7.660	0.011	257.780	64.445	3.820	0.059	7.036×10^{-3}	1.759×10^{-3}	18.240	0.001
线性	4	12 592.700	3 148.180	7.660	0.011	257.780	64.445	3.820	0.059	7.036×10^{-3}	1.759×10^{-3}	18.240	0.001
X ₁	1	7 500.000	7 500.000	18.250	0.004	141.453	141.453	8.390	0.023	5.010×10^{-3}	5.010×10^{-3}	51.960	0.000
X ₂	1	4 412.900	4 412.930	10.740	0.014	11.407	11.407	0.680	0.438	1.578×10^{-3}	1.578×10^{-3}	16.360	0.005
X ₃	1	670.200	670.210	1.630	0.242	104.903	104.903	6.220	0.041	3.920×10^{-4}	3.920×10^{-4}	4.070	0.084
X ₄	1	9.600	9.580	0.020	0.883	0.016	0.016	0.000	0.976	5.500×10^{-5}	5.500×10^{-5}	0.580	0.473
误差	7	2 877.400	411.060			117.988	16.855			6.750×10^{-4}	9.600×10^{-5}		
合计	11	375.768				375.768				7.711×10^{-3}			

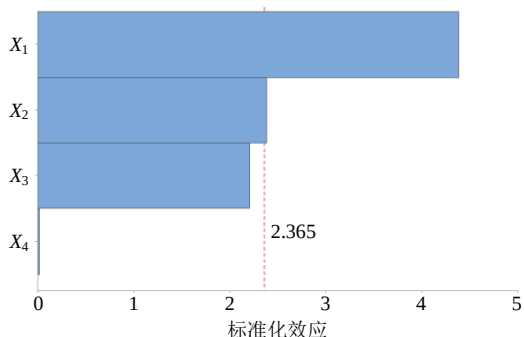


图 3 标准化效应的 pareto 图 (响应为综合评分, $\alpha = 0.05$)

Fig. 3 Pareto diagram of standardization effect (response value is a comprehensive score, $\alpha = 0.05$)

10 中 Box-Behnken 设计 3 因素 3 水平实验, 得到 17 个试验点, 其中中心点重复 5 次试验, Box-Behnken 实验设计与结果见表 4。

2.5 北刘寄奴-骨碎补提取工艺的确定和验证

运用 Box-Behnken 实验所得结果, 采用 Monte Carlo 法获取基于达标概率的设计空间, 设定计算机模拟 10 000 次, 计算步长为 0.02, 达标概率为 0.9 可以获得较为稳定可靠的结果^[34-35]。建立设计空间, 采用 Matlab (2016b) 软件提供的 Monte Carlo 仿真法计算获得北刘寄奴-骨碎补提取工艺参数的设计空间图 (图 4)。

表 4 Box-Behnken 试验设计与结果

Table 4 Box-Behnken experimental design and results

编号	X ₁ /次	X ₂ /h	X ₃ /倍	Y ₁ /mg	Y ₂ /mg	Y ₃ /%
1	2	2.0	8.0	218.12	24.17	8.68
2	2	2.0	15.0	296.80	35.37	10.66
3	3	2.0	11.5	386.24	40.92	12.27
4	2	1.0	8.0	231.17	21.42	8.08
5	2	1.5	11.5	294.83	26.13	9.56
6	3	1.5	15.0	373.39	40.73	11.94
7	1	1.0	11.5	132.35	15.61	5.59
8	2	1.0	15.0	266.76	30.12	9.24
9	2	1.5	11.5	260.91	28.68	9.82
10	2	1.5	11.5	279.03	25.12	9.58
11	1	2.0	11.5	187.65	21.19	7.12
12	1	1.5	15.0	189.37	21.78	7.53
13	2	1.5	11.5	278.69	29.66	9.26
14	1	1.5	8.0	127.54	13.25	5.55
15	3	1.5	8.0	267.44	23.40	10.41
16	2	1.5	11.5	280.22	25.63	9.37
17	3	1.0	11.5	309.85	24.49	9.20

在最佳提取工艺范围分别选取点内 (-1, 0.9, -0.9)、点外 (-0.9, 0.94, -0.78) 平行进行 2 组实

验,测定柚皮苷量、木犀草素量、干膏率,结果表明点内 A 的各项指标及综合评分均优于点外 B,验证结果见表 5。从验证结果可得该模型具有较好的预测能力,且在设计空间内操作能保证提取液质量的稳定性。

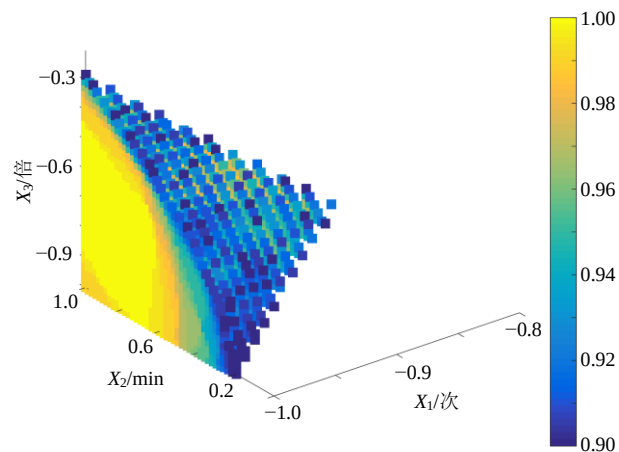


图 4 北刘寄奴-骨碎补提取工艺设计空间图

Fig. 4 Space diagram of extraction process design of SH-DR

表 5 设计空间结果验证

Table 5 Verification of design space results

编号	X ₁ /次	X ₂ /min	X ₃ /倍	Y ₁ /mg	Y ₂ /mg	Y ₃ /%	综合评分
1	2	116	10	127.78	26.39	9.81	99.99
2	2	116	10	126.04	18.03	9.56	86.27
3	1	114	9	76.57	15.19	6.38	60.01
4	1	114	9	79.04	13.01	5.95	56.60

3 讨论

目前多数提取工艺研究采用 1 个或多个化学成分作为指标成分,但这些成分是否为其有效成分并未得到充分的研究,只是引用文献进行说明。本实验在提取工艺选择指标时,采用网络药理学对方剂治疗 AS 的成分进行筛选确定,再结合文献和《中国药典》2020 年版一部相关北刘寄奴、骨碎补药材项下的指标性成分,最终选取木犀草素、柚皮苷为本研究中的指标性成分。

本研究基于质量来源于设计理念,以北刘寄奴-骨碎补提取工艺为例建立其设计空间,选取柚皮苷、木犀草素和干膏率作为关键评价指标,采用设计空间法研究工艺与质量参数的关联性,通过文献研究和前期实验确定提取次数、提取时间、乙醇体积分数、加溶媒倍数为影响北刘寄奴-骨碎补提取过程的 CPP,对结果进行方差分析,结果表明提取次数、提取时间、加溶媒倍数对提取工艺影响较大。通过

Box-Behnken 实验设计探究 CPP 和 CQA 的相关性,采用 Monte Carlo 法进行模拟计算,最终得到北刘寄奴-骨碎补提取工艺参数操作空间为提取次数 3 次,每次提取时间 2~3 h,加溶媒倍数为 11~15 倍,乙醇体积分数为 45%。经验证设计空间内选取的点的各项指标均优于设计空间外,验证结果与预测结果基本一致,大生产中采用设计空间法达到工艺可调的目的,在中药原药材质量波动较大的情况下也能最终保证中药制剂质量稳定可控^[16]。

近年来,世界各国都在提倡低碳经济,随着我国医药市场的快速开发和国际市场对天然产物需求的持续增长,中药产业将成为我国药品行业经济发展中心之一,中药材的提取在传统工艺过程中,多采用单因素实验和正交实验进行工艺优化,并采取固定的提取工艺参数进行生产,可能存在过度提取的弊端,导致产品质量不同批次或同一批次间波动范围较大^[36]。而设计空间的建立,则是对原料药材提取工艺范围进行确定,可以根据生产设备条件、原料药材的质量以及不同的环境在设计空间范围内对工艺参数进行调节,保证中间体、最终产品的质量稳定性^[37]。同时,将进一步提高工艺参数与产品质量之间的关联性,保证产品同一批次产品质量一致性,做到安全有效、均一可控^[38]。除此之外,设计空间的建立提高了重要分析方法的耐用性,分析多个变量间的相互作用,减少了提取时间、能源消耗^[39],从而可能降低碳排放量、提高生产效率、降低生产成本,推动低碳经济发展。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 李惠婷,孟景红,顾光,等.强直性脊柱炎合并髋关节受累的临床特点[J].临床荟萃,2021,36(6):500-503.
- [2] 罗韵,高维旭.强直性脊柱炎的药物疗法进展[J].中国乡村医药,2021,28(14):79-80.
- [3] 刘巧灵,范春梅,苏丽丽.HLA-B27 抗原检测与基因检测在强直性脊柱炎诊断中的应用[J].细胞与分子免疫学杂志,2017,33(6):826-828.
- [4] 尹学永,王志文,冯宝静,等.腰痛宁胶囊联合艾瑞昔布片治疗强直性脊柱炎寒湿瘀阻证 60 例临床观察[J].中草药,2020,51(21):5426-5430.
- [5] 俞佳,汪悦,甘可,等.汪悦治疗强直性脊柱炎经验[J].辽宁中医杂志,2020,47(11):58-60.
- [6] 仇维彬,安阳,刘灿,等.强直性脊柱炎中医治疗概况及优势[J].风湿病与关节炎,2021,10(7):44-46.
- [7] 阎小萍,陶庆文,孔维萍,等.补肾强督法为主的综合疗法治疗强直性脊柱炎临床和实验系列研究[J].风湿

- 病与关节炎, 2012, 1(3): 10-18.
- [8] 张红珍, 刘建春, 王青, 等. 补阳还五汤含药鼠血清对血管平滑肌细胞 Rho 激酶及 TFmRNA、基质金属蛋白酶 MMP-2 mRNA、MMP-9 mRNA 表达的影响 [J]. 中华中医药学刊, 2021, 39(1): 17-21.
- [9] 谭登, 方彭华, 孙旭, 等. 补肾通络方通过抑制 chemerin 及炎症因子干预骨质疏松症的机制研究 [J]. 中草药, 2021, 52(19): 5899-5909.
- [10] 魏海英, 宋立文. 健脾益肾壮骨汤治疗原发性骨质疏松症的疗效及对血清 IGF-1 MMP-9 ET-1 水平的影响 [J]. 河北医学, 2021, 27(12): 2101-2105.
- [11] 王桂珍, 黄传兵, 汪元, 等. 痹祺胶囊对强直性脊柱炎患者的临床疗效及细胞因子的影响 [J]. 中草药, 2020, 51(21): 5566-5570.
- [12] 湛顺清, 梁伟, 张雪妹, 等. 骨碎补化学成分和药理作用研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2021, 46(11): 2737-2745.
- [13] 宋双红, 余倩, 王喆之, 等. 骨碎补防治骨质疏松研究概况 [J]. 生命的化学, 2015, 35(1): 73-80.
- [14] 封歌俊, 达德丽, 王海东, 等. 从肝、肾、督角度探讨强直性脊柱炎分期治疗思路 [J]. 亚太传统医药, 2019, 15(4): 82-84.
- [15] 张强坤, 周星宇, 王晓龙, 等. 基于三焦理论治疗强直性脊柱炎的理论探讨 [J]. 中医药临床杂志, 2021, 33(8): 1415-1417.
- [16] 徐冰, 史新元, 乔延江, 等. 中药制剂生产工艺设计空间的建立 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(6): 924-929.
- [17] 李思颖, 李佳川, 宋琴, 等. 基于“关键成分-潜在靶点-核心通路”交互网络的酒蒸黄连生物碱-石菖蒲挥发油配伍防治糖尿病认知功能障碍机制研究 [J]. 中草药, 2021, 52(19): 5910-5921.
- [18] 卜雕雕, 苏卓, 柏希慧, 等. 基于网络药理学的丹参-红花治疗心肌梗死的作用及其机制研究 [J]. 中草药, 2020, 51(10): 2807-2818.
- [19] 邓燕君, 刘博文, 贺桢翔, 等. 基于网络药理学和分子对接法探索藿香正气口服液预防新型冠状病毒肺炎 (COVID-19) 活性化合物研究 [J]. 中草药, 2020, 51(5): 1113-1122.
- [20] 刘树森, 孙文斌, 李文兰, 等. 基于网络药理学的黄连-吴茱萸药对抗癌及治疗心脑血管疾病机制研究 [J]. 中草药, 2020, 51(1): 109-117.
- [21] 刘钱, 贺桢翔, 杨慧, 等. 基于网络药理学和分子对接法探索肺毒清治疗新型冠状病毒肺炎 (COVID-19) 的潜在活性成分 [J]. 中草药, 2020, 51(7): 1713-1722.
- [22] 姚运秀, 贺桢翔, 刘晓凤, 等. 基于网络药理学和分子对接技术的抗病毒颗粒治疗新型冠状病毒肺炎 (COVID-19) 的潜在物质基础研究 [J]. 中草药, 2020, 51(6): 1386-1396.
- [23] 钟林江, 杨俊莉, 奉梅, 等. 基于数据挖掘的金莲花系列制剂治疗上呼吸道感染的作用机制 [J]. 成都大学学报: 自然科学版, 2021, 40(1): 1-7, 30.
- [24] Liu Q, Xu Y L, Liu B W, et al. Identification of the mechanism of feiduqing on viral pneumonia based on network pharmacology analysis [J]. Nat Prod Commun, 2021, 16(8): 1934578X2110314.
- [25] 罗虹, 刘博文, 杨慧, 等. 基于网络药理学及活性成分测定的六味地黄系列制剂质量研究 [J]. 中草药, 2020, 51(21): 5462-5477.
- [26] 孙亦鹏. 基于数据挖掘探讨周翠英教授治疗强直性脊柱炎的经验 [D]. 济南: 山东中医药大学, 2016.
- [27] Liu K, Wu L G, Shi X L, et al. Protective effect of naringin against ankylosing spondylitis via ossification, inflammation and oxidative stress in mice [J]. Exp Ther Med, 2016, 12(2): 1153-1158.
- [28] 沈晓华, 王小平, 陈育青. 聚酰胺树脂分离纯化蜜柚皮中柚皮苷的研究 [J]. 中国中医药现代远程教育, 2021, 19(7): 145-148.
- [29] 承晨, 李莉. HPLC 法同时测定代代花中柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷和辛弗林的含量 [J]. 药学与临床研究, 2020, 28(4): 263-265.
- [30] 聂健. 骨碎补总黄酮水提工艺的优化 [J]. 轻工科技, 2019, 35(8): 48-49.
- [31] 张智, 杨柳, 尹文哲, 等. 提取骨碎补中柚皮苷的研究 [J]. 中国林副特产, 2019(2): 1-4.
- [32] 李俊芳, 肖学风, 于国华, 等. 强筋健骨方回流提取工艺的优化 [J]. 中成药, 2017, 39(2): 301-304.
- [33] 左军, 张文钊, 栗波, 等. 骨松停胶囊提取工艺研究 [J]. 中医药学报, 2015, 43(3): 81-84.
- [34] 邵静媛, 瞿海斌, 龚行楚. 2 种设计空间计算方法的比较研究: 达标概率法和多指标叠加法 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43(10): 2074-2080.
- [35] 刘博文, 戴静, 刘晓凤, 等. 基于网络药理学和设计空间的乳腺康提取工艺研究 [J]. 中草药, 2021, 52(6): 1634-1644.
- [36] 陈桢, 李冰韶, 王永洁, 等. 设计空间法优化红花温浸提取工艺 [J]. 中草药, 2018, 49(19): 4544-4551.
- [37] 陈霞, 阳长明, 陈浩, 等. 基于中药复方制剂特点的中药复方制剂生产工艺研究 [J]. 中草药, 2021, 52(19): 5807-5813.
- [38] 张建, 张欣, 毕宇安, 等. 设计空间法研究龙血竭酚类提取物的精制工艺 [J]. 中国中药杂志, 2017, 42(18): 3546-3552.
- [39] 戴胜云. 中药 HPLC 分析设计空间的建立与可靠性研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2016.

[责任编辑 郑礼胜]