

Box-Behnken 响应面结合基准关联度和 AHP-熵权法优化经典名方半夏泻心汤的提取工艺

樊箫雨, 杨凯丽, 李花花, 杨麒麟, 杨天姿, 白洁*, 杜守颖*

北京中医药大学中药学院, 北京 102488

摘要: 目的 评价现代工艺与传统制法得产品质量的一致性, 从质量源于设计的理念出发, 应用 Box-Behnken 响应面设计结合基准关联度和层次分析法(AHP)-熵权法, 确定经典名方半夏泻心汤(Banxia Xiexin Decoction, BXD)的提取工艺参数。方法 以 BXD 中小檗碱、黄芩苷、甘草酸含量及出膏率和指纹图谱相似度为关键质量属性, 以料液比、提取时间、提取次数为关键工艺参数, 采用单因素实验确定各因素水平, Box-Behnken 设计试验、基准关联度和 AHP-熵权法确定指标权重系数, 进行综合评分。根据综合评分建立函数模型, 反映各因素与响应值之间的关系, 优化提取工艺参数并进行验证。结果 Box-Behnken 响应面连用基准关联度和 AHP-熵权法建立的工艺评价函数模型: 综合评分 = $SR_{i \text{ 出膏率}} \times 41.7\% + SR_{i \text{ 小檗碱}} \times 41.5\% + SR_{i \text{ 黄芩苷}} \times 6.1\% + SR_{i \text{ 甘草酸}} \times 5.2\% + SR_{i \text{ 指纹图谱相似度}} \times 5.5\%$, 该模型稳定可靠, 确定最佳提取工艺为全方饮片加 7 倍量水, 提取 0.5 h, 提取 1 次。验证试验综合评分均值为 87.37, RSD 为 2.09%, 符合基准物质标准的要求, 且方法具有适用性。结论 筛选的 BXD 现代提取工艺参数具有可行性, 为其他经典名方的开发利用提供理论依据。

关键词: 半夏泻心汤; 质量源于设计; 提取工艺; 基准关联度; 层次分析法; 信息熵权法; Box-Behnken 响应面; 小檗碱; 黄芩苷; 甘草酸

中图分类号: R283.6

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2022)21-6716-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.21.008

Optimization of extraction process for classical prescription Banxia Xiexin Decoction based on Box-Behnken design-response surface, standard relation and analytic hierarchy process combined with entropy method

FAN Xiao-yu, YANG Kai-li, LI Hua-hua, YANG Qi-lin, YANG Tian-zi, BAI Jie, DU Shou-ying

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

Abstract: Objective To evaluate the consistency of the quality of preparations manufactured by modern technology and traditional methods, starting from the concept that quality by design, the extraction process parameters of the classic famous prescription Banxia Xiexin Decoction (半夏泻心汤, BXD) were determined by using Box-Behnken design-response surface method combined with standard relation and analytic hierarchy process (AHP) - entropy method. **Methods** The content of berberine, baicalin and glycyrrhizic acid, extraction rate and the similarity of fingerprints were taken as the key evaluation indexes, the solid-liquid ratio, the extraction time and the extraction times were taken as the experimental factors, the different levels of each factor were determined by single factor test. Box-Behnken design-response surface method, standard relation and AHP entropy method were used to determine the weight and conduct comprehensive scoring. According to the comprehensive score, a functional model was established to reflect the relationship between each factor and comprehensive score, and the extraction process parameters were optimized and verified. **Results** A process evaluation function model was established by using Box-Behnken experimental design combined with standard relation and AHP - entropy method as follow: comprehensive score = $SR_{i \text{ paste yield}} \times 41.7\% + SR_{i \text{ berberine}} \times 41.5\% + SR_{i \text{ baicalin}} \times 6.1\% + SR_{i \text{ glycyrrhizic acid}} \times 5.2\% + SR_{i \text{ fingerprint similarity}} \times 5.5\%$. The function model was stable and reliable. The optimal extraction process was to add seven times of water to the whole decoction pieces, extract for 0.5 h and once. The average score of the validation test was

收稿日期: 2022-05-17

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2021YFE0201000)

作者简介: 樊箫雨, 女, 硕士研究生, 研究方向为中药新剂型与新技术。E-mail: xfanxiaoyu@163.com

*通信作者: 白洁, 副教授, 硕士生导师, 主要从事中药新剂型与新技术研究。Tel: (010)84738657 E-mail: baijie22811@163.com

杜守颖, 教授, 博士生导师, 主要从事中药新剂型与新技术研究。Tel: (010)84738615 E-mail: Dushouying@263.net

87.37, and the RSD was 2.09%, which met the requirements of the reference material standard, and the method was applicable.

Conclusion The modern extraction parameters of BXD screened by this method were feasible, which provided a theoretical basis for the development and utilization of other classic prescriptions.

Key words: Banxia Xiexin Decoction; quality by design; extraction process; standard relation; analytic hierarchy process; information entropy method; Box-Behnken design-response surface method; berberine; baicalin; glycyrrhizic acid

半夏泻心汤 (Banxia Xiexin Decoction, BXD) 出自东汉张仲景的《伤寒杂病论》, 2018 年选入《古代经典名方目录 (第一批)》^[1]。书中记载“半夏半升 (洗), 黄芩、干姜、人参、甘草 (炙) 各三两, 黄连一两, 大枣十二枚 (擘)。上七味, 以水一斗, 煮取六升, 去滓, 再煎取三升, 温服一升, 日三服”^[2]。具有平调寒热、散结消痞之功, 用于治疗小柴胡汤证误下所致的脾胃受损、邪陷心下、胃气痞塞而寒热互结之痞证。现代临床常用于治疗胃溃疡、胃炎、糖尿病胃轻瘫、胃食管反流病、胃癌术后状态等消化系统疾病^[3-6]。2022 年 8 月 1 日, 国家药品监督管理局发布《古代经典名方关键信息表 (25 首方剂) (征求意见稿)》^[7], 公布了 BXD 的关键信息, 对方中所用饮片规格、用法用量及煎煮方法做以详细说明。

根据 2021 年 8 月国家药品监督管理局药品审评中心发布的《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)》^[8] (简称《原则》), 要求经典名方的开发利用需按照国家发布的古代经典名方关键信息及古籍记载, 研究、制备基准物质, 制剂质量应与制得基准物质的质量基本保持一致, 从而确定商业规模的制剂生产工艺。但考虑到现代工业化大生产过程难以与古法记载提取工艺保持一致, 使经典名方现代生产工艺制剂质量与传统制法保持一致仍存在很多困难。因此需摒弃传统提取工艺设计默认各指标最高即为最优的原则, 以基准物质的质量作为参比标准。而基准物质有多个质控指标, 在工艺考察时需同时满足各指标的质量要求, 以往常用的试错性的研究就不再适用, 这使得实验设计需综合考虑各因素的影响。因此在经典名方的开发中, 既要考虑经典名方整体用药的中医特色, 又要满足制剂评价指标多, 质量范围明确的要求。为合理开发经典名方, 本实验从质量源于设计 (quality by design, QbD) 的理念出发, 加强对制剂源头及过程的控制, 将样品质量控制从成品检验移至前期工艺设计及生产过程中, 从设计层次保证制剂质量^[9]。通过引入基准关联度 (standard relation, SR) 和层次分析 (analytic hierarchy process,

AHP)-熵权法, 将基准物质质量设为标准值, 将测得值与之相比, 计算 SR, SR 越接近 100%, 表明制得制剂与基准物质越接近, 说明该工艺参数下制得制剂与基准物质最相符^[10]。同时利用 AHP-熵权法将中医用药的君臣佐使原则与各指标含量对制剂质量的影响程度相结合。根据处方中不同药味的重要程度选择测量指标, 对其进行主观赋权, 然后再对主观赋权确定的各指标测量结果进行分析, 根据各指标对制剂质量的影响程度进行客观赋权。该方法在常规客观比较含量高低的维度之上, 从经典名方中医用药的角度出发, 对方中的君药、臣药、使药分别主观赋权, 从 2 个维度确定测定指标的权重系数, 以获得更为真实可靠的测定结果, 最终确定最佳工艺。这一思路既考虑了经典名方开发中需保持与基准物质一致的要求, 又体现了中医用药整体性的特点, 对方中不同药味的作用以权重侧重, 为经典名方类制剂的开发提供了思路。

1 仪器与材料

1.1 仪器

JM-B100002 型电子天平, 万分之一, 余姚市纪铭称重校验设备有限公司; 赛多利斯 BSA224S 型电子分析天平, 千分之一, 赛多利斯科学仪器 (北京) 有限公司; 华美冠药煲, 江西省华美冠瓷业有限公司; HH6-型电热恒温水浴锅、MH-2000 型可调式电热套 2000 mL、MH-3000 可调式电热套 3000 mL、MH-5000 可调式电热套 5000 mL 北京科伟永兴仪器有限公司; H22-X3 型九阳电陶炉, 杭州九阳生活电器有限公司; 屹立 QE-200 型高速万能离心机、DZF-6051 型真空干燥器, 北京利康达圣科技有限公司; QE-100 型高速粉碎机, 浙江屹立工贸有限公司; BY-400C-1 型医用离心机、SHB-III 型循环水式多用真空泵, 郑州长城科工贸有限公司; KQ5200DA 型数控超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; Thermo Fisher U3000 型高效液相色谱仪, DAD 检测器, CM7.2 色谱工作站, 赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司。

1.2 试药

对照品黄芩苷 (批号 110715-202122, 质量分

数 94.2%)、盐酸小檗碱(批号 110713-202015, 质量分数 85.9%)、甘草铵(批号 110731-202021, 质量分数 96.2%)均购自于中国食品药品检定研究院。乙腈、甲醇、磷酸和三乙胺均为色谱纯, 购自 Thermo Scientific 服务科学-赛默飞世尔中国公司; 无水甲醇和无水乙醇均为分析级, 购自北京化工厂; 纯净水, 购自杭州娃哈哈集团有限公司。

炒甘草(批号 1-20200804)购自宁夏昊翔有限公司, 清半夏(批号 1-20011403)、黄芩(批号 1-19030403)、干姜(批号 19022826)、人参(批号 1-19112601)、黄连(批号 1-19031910)、大枣(批号 20030908)均由河北万岁药业有限公司提供, 经北京中医药大学赵婷讲师鉴定, 清半夏为天南星科半夏属植物半夏 *Pinellia ternata* Breit. 的干燥块茎、黄芩为唇形科黄芩属植物黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi 的干燥根、干姜为姜科姜属植物姜 *Zingiber officinale* Rosc. 的干燥根茎、人参为五加科人参属植物人参 *Panax ginseng* C. A. Mey. 的干燥根和根茎、炒甘草为豆科甘草属植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根和根茎、黄连为毛茛科黄连属植物黄连 *Coptis chinensis* Franch. 的干燥根茎、大枣为鼠李科枣属植物枣 *Ziziphus jujuba* Mill. 的干燥成熟果实, 均符合《中国药典》2020 年版^[1]饮片标准。

2 方法与结果

2.1 BXD 基准物质的制备

称取清半夏 55.2 g, 黄芩 41.4 g, 干姜 41.4 g, 人参 41.4 g, 炒甘草 41.4 g, 黄连 13.8 g, 大枣 36.0 g 于陶瓷锅中, 加水 2000 mL, 武火加热至沸腾后, 文火煎煮至药液为 1200 mL, 趁热滤过, 滤液用文火煎煮至药液体积至 600 mL, 得 BXD 水煎液。

根据《原则》^[8]中的要求, 基准样品一般为浓缩浸膏或干燥品, 可考虑采用低温浓缩、冷冻干燥等方法制备。故选用冷冻干燥法制备 BXD 基准物质。精密移取制得 BXD 水煎液 5 mL 于 25 mL 的西林瓶中, 于-20 ℃预冷冻 12 h, 迅速转移至-80 ℃的真空冷冻干燥机(提前预冷 2 h)中, 设置冻干温度-80 ℃, 真空度(3±1) Pa, 干燥 72 h 后取出, 即得 BXD 基准物质。

2.2 出膏率的测定

量取制得 BXD 提取液 200 mL, 置于恒定质量的 250 mL 干燥蒸发皿中, 水浴浓缩至稠膏, 置于真空干燥箱中, 60 ℃真空干燥 72 h, 称定干膏质量,

经公式(1)计算后, 即得半夏泻心汤的实际出膏率。

$$\text{全方出膏率} = mV/(200M) \quad (1)$$

m 为 200 mL 提取液中干膏质量, V 为提取液总体积; M 为投料饮片质量

2.3 指纹图谱的测定

2.3.1 色谱条件 参考课题组前期研究结果^[12]。色谱柱为 Thermo Hypersil Glod C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-0.05%三乙胺水溶液(磷酸调 pH 2.2), 梯度洗脱: 0~8 min, 3%甲醇; 8~15 min, 3%~10%甲醇; 15~28 min, 10%~23%甲醇; 28~53 min, 23%甲醇; 53~73 min, 23%~29%甲醇; 73~80 min, 29%~38%甲醇; 80~85 min, 38%甲醇; 85~107 min, 38%~53%甲醇; 107~120 min, 53%~71%甲醇; 120~130 min, 71%甲醇; 体积流量为 1 mL/min; 检测波长为 345 nm; 进样量为 5 μL; 柱温 30 ℃。

2.3.2 供试品溶液的制备

(1)BXD 基准物质供试品溶液: 取制得的 BXD 基准物质, 精密加入 5 mL 去离子水于西林瓶中, 密封, 超声(250 W、40 kHz) 15 min, 使其充分溶解, 取出, 放冷, 摇匀后, 取 4 mL 于 10 mL 离心管中 10 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得 BXD 基准物质供试品溶液。

(2)BXD 水煎液供试品溶液: 精密量取制得的水煎液 5 mL 于 10 mL 离心管中, 10 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得水煎液供试品溶液。

2.3.3 指纹图谱的建立及相似度分析 分别取“2.3.2”项下制得基准物质供试品溶液及水煎液供试品溶液, 按“2.3.1”项下色谱条件进样, 测定指纹图谱。将色谱结果以 cdf. 的格式导入 2012 年版《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》进行评价, 因黄芩苷色谱峰峰面积较大, 在特征图谱里贡献度较高, 使得整个特征图谱因黄芩苷的贡献度大而相似度高, 难以反映特征图谱的真实情况。因此首先对黄芩苷峰进行 Mark 峰匹配, 比较黄芩苷峰的差异性, 若无明显差异, 再剔除黄芩苷, 以中位数法, 时间窗宽度为 0.1 s 的模式进行全谱峰匹配, 计算指纹图谱的相似度。

2.4 黄芩苷和小檗碱含量测定

2.4.1 色谱条件 同“2.3.1”项下。

2.4.2 对照品溶液的制备 精密称取黄芩苷对照品

18.65 mg 于 50 mL 量瓶中,加 70%乙醇溶解并定容至刻度,配成质量浓度为 351.366 $\mu\text{g/mL}$ 的黄芩苷对照品溶液。精密称取盐酸小檗碱对照品 10.48 mg 于 100 mL 量瓶中,加入 70%乙醇溶解并定容至刻度,配成质量浓度为 90.023 2 $\mu\text{g/mL}$ 的盐酸小檗碱母液;再精密移取 5 mL 至 50 mL 量瓶中,加入 70%乙醇溶解并定容至刻度,配制质量浓度为 9.00 $\mu\text{g/mL}$ 的盐酸小檗碱对照品溶液。

2.4.3 供试品溶液的制备 同“2.3.2 (2)”项下。

2.4.4 样品测定 取“2.4.2”项下制得对照品溶液及“2.4.3”项下制得供试品溶液,按“2.4.1”项下色谱条件进样,测定黄芩苷及小檗碱含量。

2.5 甘草酸含量测定

2.5.1 色谱条件 参照《中国药典》2020 年版^[11]一部甘草项下含量测定色谱条件。色谱柱为 Thermo Hypersil Glod C₁₈ (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm);流动相为乙腈-0.05%磷酸水溶液,梯度洗脱: 0~8 min, 19%乙腈; 8~35 min, 19%~50%乙腈; 35~36 min, 50%~100%乙腈; 36~40 min, 100%~19%乙腈;体积流量为 1 mL/min;检测波长为 237 nm;进样量为 5 μL ;柱温 30 $^{\circ}\text{C}$ 。

2.5.2 对照品溶液的制备 精密称取甘草酸铵对照品 10.20 mg 于 100 mL 量瓶中,加 70%乙醇溶解并定容至刻度,配制质量浓度为 102.00 $\mu\text{g/mL}$ 的甘草酸对照品溶液。

2.5.3 供试品溶液的制备 同“2.3.2 (2)”项下。

2.5.4 样品测定 取“2.5.2”项下制得对照品溶液及“2.5.3”项下制得供试品溶液,按“2.5.1”项下色谱条件进样,测定甘草酸含量。

2.6 BXD 基准物质的测定

取制得基准物质,按“2.2”~“2.5”项下方法测定 BXD 基准物质的出膏率及各指标成分含量,课题组前期建立基准物质出膏率及指标性成分含量

范围及本实验测定结果见表 1,其中含量范围的上下限参考《原则》^[8]中相关要求:干膏率的波动范围一般不超过均值的 $\pm 10\%$,指标成分的含量波动范围一般不超过均值的 $\pm 30\%$ 。高效液相色谱图如图 1 所示。

2.7 单因素考察提取时间、加水倍量对 BXD 提前效果的影响

2.7.1 提取时间 依次称取处方量的饮片于 5 L 圆底烧瓶中,加入 10 倍处方量的去离子水进行回流提取,分别提取 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 h,测定提取液中黄芩苷、小檗碱、甘草酸含量及出膏率,确定提取时间的低水平及高水平,结果如表 2 所示。

表 1 BXD 基准物质中指标成分含量及出膏率

Table 1 Index component content and paste rate of standard reference of BXD

基准物质		质量分数/($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)			出膏率/%
		小檗碱	黄芩苷	甘草酸	
前期实验	均值	0.350	9.283	2.338	16.06
	下限	0.201	7.579	1.710	14.32
	上限	0.372	14.075	3.176	17.50
本实验		0.287	10.827	2.443	15.91

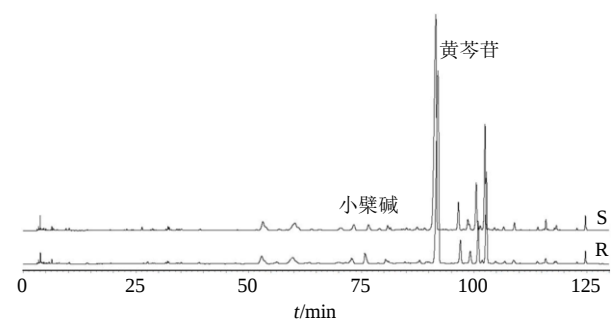


图 1 本实验 (S) 和前期实验 (R) 制备的 BXD 基准物质的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC of BXD standard reference prepared in this experiment (S) and previous experiment (R)

表 2 提取时间考察结果

Table 2 Results of extraction time

提取时间/h	质量分数/($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)			出膏率/%
	黄芩苷	小檗碱	甘草酸	
0.5	11.609 $\pm$ 0.106	0.052 $\pm$ 0.001	3.245 $\pm$ 0.006	16.580 $\pm$ 0.028
1.0	13.194 $\pm$ 0.064	0.544 $\pm$ 0.004	3.558 $\pm$ 0.004	20.370 $\pm$ 0.042
1.5	13.471 $\pm$ 0.008	0.769 $\pm$ 0.003	3.458 $\pm$ 0.002	20.010 $\pm$ 0.035
2.0	13.305 $\pm$ 0.004	0.896 $\pm$ 0.008	3.346 $\pm$ 0.005	20.130 $\pm$ 0.035
2.5	12.241 $\pm$ 0.004	0.930 $\pm$ 0.002	3.266 $\pm$ 0.005	20.270 $\pm$ 0.057
3.0	12.421 $\pm$ 0.003	1.107 $\pm$ 0.004	3.169 $\pm$ 0.009	22.530 $\pm$ 0.092

黄芩苷和甘草酸含量均呈先上升后下降趋势,黄芩苷含量在 1.5 h 时达到峰值,甘草酸在 1.0 h 时达到峰值;小檗碱含量呈上升趋势。出膏率在 0.5 h 时较低,1.0~2.5 h 无明显区别,3.0 h 时较高。结合不同指标成分在基准物质中的含量,最终确定提取时间的高低水平分别为 1.5、0.5 h。

2.7.2 料液比 依次称取处方量的饮片于圆底烧瓶

中,分别以料液比为 1:5、1:7、1:9、1:11、1:13、1:15 加水提取,提取 1.5 h,测定提取液中黄芩苷、小檗碱、甘草酸含量及出膏率,确定料液比的低水平及高水平,结果如表 3 所示。随着料液比的增加,各指标成分及出膏率呈上升趋势,未见峰值出现,参考不同指标成分在基准物质中的含量,最终确定料液比的高低水平分别为 1:9 及 1:5。

表 3 不同料液比条件下指标性成分含量及出膏率

Table 3 Index component content and paste rate under different solid-liquid ratio

料液比	质量分数/(mg·g ⁻¹)			出膏率/%
	黄芩苷	小檗碱	甘草酸	
1:5	8.668±0.004	0.461±0.002	1.768±0.003	14.090±0.028
1:7	10.926±0.005	0.613±0.006	2.554±0.005	16.910±0.028
1:9	11.784±0.001	0.635±0.002	7.826±7.075	19.670±0.035
1:11	13.054±0.004	0.698±0.001	3.066±0.004	21.370±0.028
1:13	13.323±0.003	0.694±0.003	3.388±0.002	21.790±0.021
1:15	14.211±0.002	0.794±0.004	3.647±0.004	22.880±0.035

2.8 BXD 提取工艺参数的 Box-Behnken 试验设计

(1) 关键质量属性 (critical quality attributes, CQAs) 和关键工艺参数 (critical process parameters, CPPs) 的确定: 结合 BXD 的临床应用及实际操作性, 选择 3 个指标成分含量 (黄芩苷、小檗碱、甘草酸)、出膏率及指纹图谱相似度作为 BXD 制剂工艺的 CQAs。选择料液比 (x_1)、提取时间 (x_2)、提取次数 (x_3) 作为 BXD 制剂提取工艺的 CPPs^[13]。

(2) Box-Behnken 试验设计: 根据单因素实验考察结果, 确定料液比及提取时间的范围, 提取次数根据实际生产需求及经验分别设计为 1、2、3 次。依次称取处方量的饮片进行 Box-Behnken 设计, 选取料液比、提取时间和提取次数 3 个影响因素, 设置 3 个水平 17 个试验点的响应面分析, 其中 12 个析因点, 5 个中心点, 实验设计因素及结果见表 4。

2.9 SR 的原理方法

2.9.1 确定评价对象 SR 可用于评价样品与基准物质相似度的关键参数, 需首先确定样品评价的指标数目 n 与样品数目 m ^[10], 基本研究路线如图 2 所示。本研究将 Box-Behnken 设计生成的 17 个样品和基准物质进行对比, 以黄芩苷、小檗碱、甘草酸的含量、出膏率及指纹图谱相似度为评价指标, 以 X_{ij} 、 S_j 为评价对象, X_{ij} 表示 Box-Behnken 设计的第 i ($i=1, 2, \dots, m$) 个样本的第 j ($j=1, 2, \dots, n$) 个指标下的测量值, S_j 表示基准物质的第 j ($j=1,$

$2, \dots, n$) 个指标下的测量值。

2.9.2 计算相对偏差 (relative deviation, RD_{ij}) 值 RD_{ij} 表示第 i ($i=1, 2, \dots, m$) 个样本的第 j ($j=1, 2, \dots, n$) 个指标下的 RD_{ij} , RD_{ij} 越小则表明代表 X_{ij} 相对于 S_j 的偏差越小, 即该条件下制得样品质量与基准物质相似度更高。

计算公式如公式 (2) 所示, 计算结果表明, 当以小檗碱、甘草酸和出膏率为评价指标时, 与基准物质质量最为接近的是试验 12; 当以黄芩苷为评价指标时, 与基准物质质量最为接近的是试验 9; 当以指纹图谱相似度为评价指标时, 与基准物质质量最为接近的是试验 2。由此可得, 当以单一因素为评价指标时, 试验所得最优结果会根据评价指标的变化而变化, 因此需进行综合评分后才能确定最佳提取工艺参数 (表 5)。

$$RD_{ij} = |X_{ij} - S_j| / S_j \quad (2)$$

2.9.3 计算 SR_{ij} 由于经计算 RD_{ij} 获得的最优工艺会根据评价指标的变化而变化, 无法进行综合评分, 因此在 RD_{ij} 的基础上引入 SR_{ij} 。 SR_{ij} 表示第 i ($i=1, 2, \dots, m$) 个样本的第 j ($j=1, 2, \dots, n$) 个指标下的基准关联度。即以基准物质为标准值 (S), 以 Box-Behnken 试验设计下的各样品为测得值 (X), 以不同的指标为评价指标, 按公式 (3) 计算得到 SR_{ij} , SR_{ij} 越接近 1, 在该指标下的工艺参数制得的样品与基准物质相似度越高, 结果如表 6 所示。下

表 4 Box-Behnken 试验设计及结果
Table 4 Box-Behnken experimental design and results

编号	因素			质量分数/(mg·g ⁻¹)			出膏率/%	指纹图谱 相似度	综合评分
	x ₁	x ₂ /h	x ₃ /次	小檗碱	黄芩苷	甘草酸			
1	1:5 (-1)	0.5 (-1)	2 (0)	0.482	14.102	2.963	24.08	0.936	63.35
2	1:5	1.0 (0)	1 (-1)	0.496	9.663	1.913	16.47	0.983	67.09
3	1:5	1.5 (+1)	2	0.607	13.893	3.101	27.47	0.926	43.51
4	1:5	1.0	3 (+1)	0.629	15.295	3.536	30.57	0.931	37.75
5	1:9 (+1)	1.0	3	0.937	15.928	4.324	31.91	0.909	-10.21
6	1:9	1.5	2	1.037	16.395	4.150	30.76	0.902	-24.46
7	1:9	1.0	1	0.573	12.693	3.067	19.88	0.924	51.72
8	1:9	0.5	2	0.483	17.495	3.587	26.10	0.937	59.31
9	1:7 (0)	1.5	1	0.536	10.874	2.646	19.42	0.296	32.96
10	1:7	0.5	3	0.751	16.150	3.870	28.42	0.922	19.28
11	1:7	1.5	3	1.177	16.066	3.978	33.91	0.881	-46.12
12	1:7	0.5	1	0.395	10.217	2.360	16.49	0.928	80.66
13	1:7	1.0	2	0.830	16.034	3.548	25.79	0.977	11.81
14	1:7	1.0	2	0.891	15.868	3.769	26.43	0.977	2.39
15	1:7	1.0	2	0.849	16.766	3.650	26.89	0.982	8.26
16	1:7	1.0	2	0.922	16.256	3.868	26.73	0.975	-2.71
17	1:7	1.0	2	0.943	16.853	3.649	27.86	0.977	-5.93

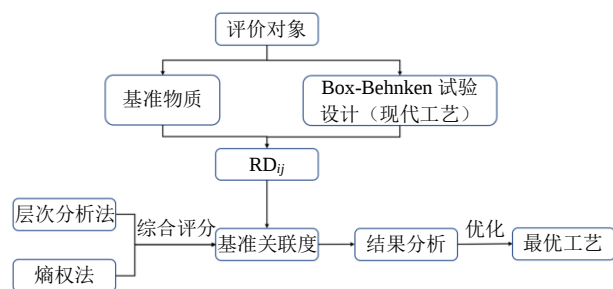


图 2 方法流程图

Fig. 2 Flow chart of algorithm

一步即可采用 AHP-熵权法确定各指标的权重系数，进行综合评分。

$$SR_{ij}=1-RD_{ij} \quad (3)$$

2.10 AHP-熵权法组合权重的计算

2.10.1 AHP 主观赋权

(1) 构建判断矩阵：根据君臣佐使原则^[14]，并结合各成分实际测得性及稳定性对评价指标的重要性进行排序。半夏泻心汤方中半夏辛温，散结消痞，降逆止呕，为君药。干姜辛热以温中祛寒；黄芩、黄连苦寒以清热燥湿，均为臣药。君臣相伍，辛开苦降，平调寒热。人参、大枣、炒甘草益气健脾，为佐药。炒甘草兼调药性，为使药。诸药合用，寒

表 5 Box-Behnken 设计 RD_{ij} 值

Table 5 RD_{ij} value of Box-Behnken design

试验号	RD _{ij}				
	小檗碱	黄芩苷	甘草酸	出膏率	指纹图谱相似度
1	0.68	0.30	0.21	0.51	0.06
2	0.73	0.11	0.22	0.04	0.02
3	1.11	0.28	0.27	0.73	0.07
4	1.19	0.41	0.45	0.92	0.07
5	2.26	0.47	0.77	1.01	0.09
6	2.61	0.51	0.70	0.93	0.10
7	1.00	0.17	0.26	0.25	0.08
8	0.68	0.62	0.47	0.64	0.06
9	0.87	0.00	0.08	0.22	0.70
10	1.62	0.49	0.58	0.79	0.08
11	3.10	0.48	0.63	1.13	0.12
12	0.38	0.06	0.03	0.04	0.07
13	1.89	0.48	0.45	0.62	0.02
14	2.10	0.47	0.54	0.66	0.02
15	1.96	0.55	0.49	0.69	0.02
16	2.21	0.50	0.58	0.68	0.03
17	2.29	0.56	0.49	0.75	0.02

表 6 Box-Behnken 设计 SR_{ij} 值
Table 6 SR_{ij} value of Box-Behnken design

试验号	SR_{ij}				
	小檗碱	黄芩苷	甘草酸铵	出膏率	指纹图谱相似度
1	32.06	69.75	78.71	48.65	93.60
2	27.18	89.25	78.31	96.48	98.30
3	-11.50	71.68	73.07	27.34	92.60
4	-19.16	58.73	55.26	7.86	93.10
5	-126.48	52.89	23.00	-0.57	90.90
6	-161.32	48.57	30.13	6.66	90.20
7	0.35	82.77	74.46	75.05	92.40
8	31.71	38.41	53.17	35.95	93.70
9	13.24	99.57	91.69	77.94	29.60
10	-61.67	50.84	41.59	21.37	92.20
11	-210.10	51.61	37.17	-13.14	88.10
12	62.37	94.37	96.60	96.35	92.80
13	-89.20	51.91	54.77	37.90	97.70
14	-110.45	53.44	45.72	33.88	97.70
15	-95.82	45.15	50.59	30.99	98.20
16	-121.25	49.86	41.67	31.99	97.50
17	-128.57	44.34	50.63	24.89	97.70

热除, 升降复, 气机畅, 则痞满消^[15-16]。根据《原则》要求^[8], 根据 BXD 中的处方组成, 结合各味药中指标性成分的实际测得性和稳定性, 因君药半夏的成分多为氨基酸类成分, 进行准确定量分析的难度较大, 故选择臣药黄芩中的黄芩苷、黄连中的小檗碱, 及使药中的甘草酸为指标性成分, 同时兼顾出膏率和指纹图谱。通过出膏率反映提取工艺的稳定性, 指纹图谱体现制剂过程中小分子成分的轮廓及定性特征。根据不同指标中所包含的质量信息, 根据 AHP 理论判断矩阵 1~9 标度, 对同一层次内 n 个指标的相对重要程度进行打分, 见表 7。因方中君药半夏、臣药干姜及人参大枣均未选择指标性成分, 故通过出膏率综合反映药效成分的提取程度, 其重要程度最高。小檗碱为臣药黄连中的有效成分, 且含量易受药材差异的影响, 需引起重点关注。黄芩苷为臣药黄芩中的有效成分, 较甘草酸明显重要。但考虑到指纹图谱可全面反映处方中所有药味的综合特征, 故将其重要程度等同于甘草酸, 因此各指标的重要程度排序为出膏率 > 小檗碱 > 黄芩苷 > 甘草酸 ≈ 指纹图谱相似度。故将出膏率相对小檗碱标为 4, 相对黄芩苷标为 5, 相对甘草酸及指纹图谱相

表 7 AHP 构建判断矩阵标准

Table 7 Criterion of constructing judgment matrix of AHP

标度	含义
1	表示 2 个因素相比, 具有相同重要性
3	表示 2 个因素相比, 前者比后者稍重要
5	表示 2 个因素相比, 前者比后者明显重要
7	表示 2 个因素相比, 前者比后者强烈重要
9	表示 2 个因素相比, 前者比后者极端重要
2、4、6、8	表示上述相邻判断的中间值
倒数	若因素 e 与因素 f 的重要性之比为 a_{ef} , 那么因素 f 与因素 e 重要性之比为 $a_{fe}=1/a_{ef}$

似度标为 6, 以此类推。根据公式 (4) 构建判断矩阵 A , 数据见表 8, 用 a_{ef} 表示因素 e 相对于因素 f 的比较结果。

$$A=(a_{ef})_{n \times n} = \begin{vmatrix} a_{11} & a_{12} & \cdots & a_{1n} \\ a_{21} & a_{22} & \cdots & a_{2n} \\ \cdots & \cdots & \cdots & \cdots \\ a_{n1} & a_{n2} & \cdots & a_{nn} \end{vmatrix} \quad (4)$$

(2) 计算主观权重系数 (W_j^S): 首先对判断矩阵 A 进行几何平均 (方根法), 按公式 (5) 计算得到初始权重系数 (W_j'), a_{jn} 表示第 j ($j=1, 2, \cdots, n$) 个指标因素对第 n ($n=1, 2, \cdots, j$) 个指标因素的比较结果, 然后按照公式 (6) 计算归一化 W_j^S , 得到 5 个指标的 W_j^S , 结果见表 9。

$$W_j'=(a_{j1}a_{j2}\cdots a_{jn})^{1/n} \quad (5)$$

表 8 指标成对比较的判断优先矩阵

Table 8 Decision matrix of paired comparison on indexes

评价指标	出膏率	小檗碱	黄芩苷	甘草酸	指纹图谱相似度
出膏率	1	4	5	6	6
小檗碱	1/4	1	3	4	4
黄芩苷	1/5	1/3	1	2	2
甘草酸	1/6	1/4	1/2	1	1
指纹图谱相似度	1/6	1/4	1/2	1	1

表 9 组合权重

Table 9 Weight value of indices

评价指标	W_j^S	W_j^O	W_j
出膏率	0.53	0.17	0.417
小檗碱	0.23	0.39	0.415
黄芩苷	0.11	0.12	0.061
甘草酸铵	0.07	0.16	0.052
指纹图谱相似度	0.07	0.17	0.055

$$W_j^S = W_j' / \sum_{j=1}^n W_j' \quad (6)$$

(3) 一致性检验: 对矩阵进行一致性检验。首先根据公式(7)计算最大特征根($\lambda_{\max}$), 再根据公式(8)计算一致性指标(consistency index, CI), 得到 CI 为 0.04, 一致性比例(consistency ratio, CR)($CR=CI/RI$, RI 为自由度指标)为 0.03, 均小于 0.1, 表明该矩阵具有一致性^[10]。

$$\lambda_{\max} = [\sum_{j=1}^n (\sum_{j=1}^n a_{jn} W_j' / W_j')] / n \quad (7)$$

$$CI = (\lambda_{\max} - n) / (n - 1) \quad (8)$$

2.10.2 信息熵客观赋权

(1) 建立 Box-Behnken 试验原始数据矩阵: 现有 m 个样本, n 个评价指标, 原始数据矩阵 $R = (X_{ij})_{m \times n}$, 以出膏率、小檗碱、黄芩苷、甘草酸含量及指纹图谱相似度 5 个指标为评价指标, 建立原始数据矩阵(R)。

(2) 将原始数据转化为概率矩阵: 根据公式(9)将原始数据矩阵 R 转化为概率矩阵(P), P_{ij} 表示第 j 个指标下第 i 个样本的概率。

$$P_{ij} = X_{ij} / \sum_{i=1}^m X_{ij} \quad (9)$$

(3) 计算各个指标的信息熵(H_j)和客观权重系数(W_j^0): 按公式(10)计算各指标的 H_j 依次为 0.993 1、0.983 7、0.994 1、0.993 5、0.993 2。 H_j 越小表示 j 指标下的数据离散程度越高, 则其提供的信息量就越大^[10]。再按公式(11)计算各指标 W_j^0 , 结果见表 9。

$$H_j = -k \sum_{i=1}^m P_{ij} \ln P_{ij}, k = 1 / \ln m \quad (10)$$

$$W_j^0 = (1 - H_j) / \sum_{j=1}^n (1 - H_j) \quad (11)$$

2.10.3 组合权重系数(W_j)的确定 采用 AHP 得到 W_j^S , 熵权法得到 W_j^0 , 根据公式(12)计算各个指标的 W_j , 结果见表 9。

$$W_j = W_j^S W_j^0 / \sum_{j=1}^n W_j^S W_j^0 \quad (12)$$

2.11 综合评分

由 AHP-熵权法算得综合权重系数可知, 出膏率占比 41.7%, 指标性成分小檗碱含量占比 41.5%, 黄芩苷含量占比 6.1%, 甘草酸含量占比 5.2%, 指纹图谱相似度占比 5.5%, 因此, 得出综合评分计算公式, 见公式(13)。计算结果见表 4 综合评分项,

综合评分越接近 100, 则表明对应工艺参数下所得样品质量与基准物质更为接近, Box-Behnken 试验中得分最高的试验组为第 12 组, 试验条件为加入 7 倍处方的水, 提取 1 次, 提取 0.5 h, 得分 80.66。

$$\text{综合评分} = SR_i \text{出膏率} \times 41.7\% + SR_i \text{小檗碱} \times 41.5\% + SR_i \text{黄芩苷} \times 6.1\% + SR_i \text{甘草酸} \times 5.2\% + SR_i \text{指纹图谱相似度} \times 5.5\% \quad (13)$$

2.12 提取工艺的优化与验证

将综合评分结果输入 Box-Behnken 试验设计表进行模型拟合, 方差分析结果见表 10。根据方差分析结果, 2 次多项式模型极显著, 失拟项不显著, 说明该模型具有统计学意义, 可用于表示各因素与响应值之间的关系。其中, x_1 和 x_3 的 $P < 0.001$, x_2 的 $P < 0.05$, 表明提取次数、提取时间和料液比对综合评分的影响均显著。影响顺序为提取次数 > 提取时间 > 料液比。 $x_2 x_3$ 的 $P < 0.05$, 表明料液比与提取时间有显著交互作用。建立的多元线性回归方程为 $Y = 2.76 - 28.97 x_1 - 16.92 x_2 - 27.09 x_3 - 8.15 x_1 x_2 - 4.43 x_1 x_3 - 15.98 x_2 x_3 + 10.05 x_1^2 + 23.78 x_2^2 + 8.89 x_3^2$, $R^2 = 0.973 2$ 。生成综合评分的等高线及响应面分析见图 3。

根据 Box-Behnken 试验生成模型进行预测, 得出最佳工艺为加水 7 倍量, 提取 0.5 h, 提取 1 次, 预测工艺与实际试验结果相符。为评价该提取方法的普遍适用性, 对优化后的工艺参数进行验证。通过平行 3 次试验, 测定小檗碱、黄芩苷、甘草酸含量, 出膏率及指纹图谱相似度, 计算综合评分, 结果见表 11。经验证, 所得样品综合评分均值为 87.37, 较 Box-Behnken 试验中同等实验条件下测得综合评分值高, 与基准物质质量接近, 且符合《原则》^[8]

表 10 Box-Behnken 设计方差分析结果

Table 10 Results of Box-Behnken design analysis of variance

误差来源	偏差平方和	自由度	F 值	P 值	显著性
模型	19 648.42	9	28.26	0.000 1	极显著
x_1	6 712.50	1	86.88	<0.000 1	极显著
x_2	2 289.44	1	29.63	0.001 0	极显著
x_3	5 870.50	1	75.98	<0.000 1	极显著
$x_1 x_2$	265.42	1	3.44	0.106 2	
$x_1 x_3$	78.40	1	1.01	0.347 3	
$x_2 x_3$	1 021.66	1	13.22	0.008 3	极显著
x_1^2	424.92	1	5.50	0.051 5	
x_2^2	2 380.71	1	30.81	0.000 9	极显著
x_3^2	332.53	1	4.30	0.076 7	
失拟项	323.19	3	1.98	0.259 2	不显著

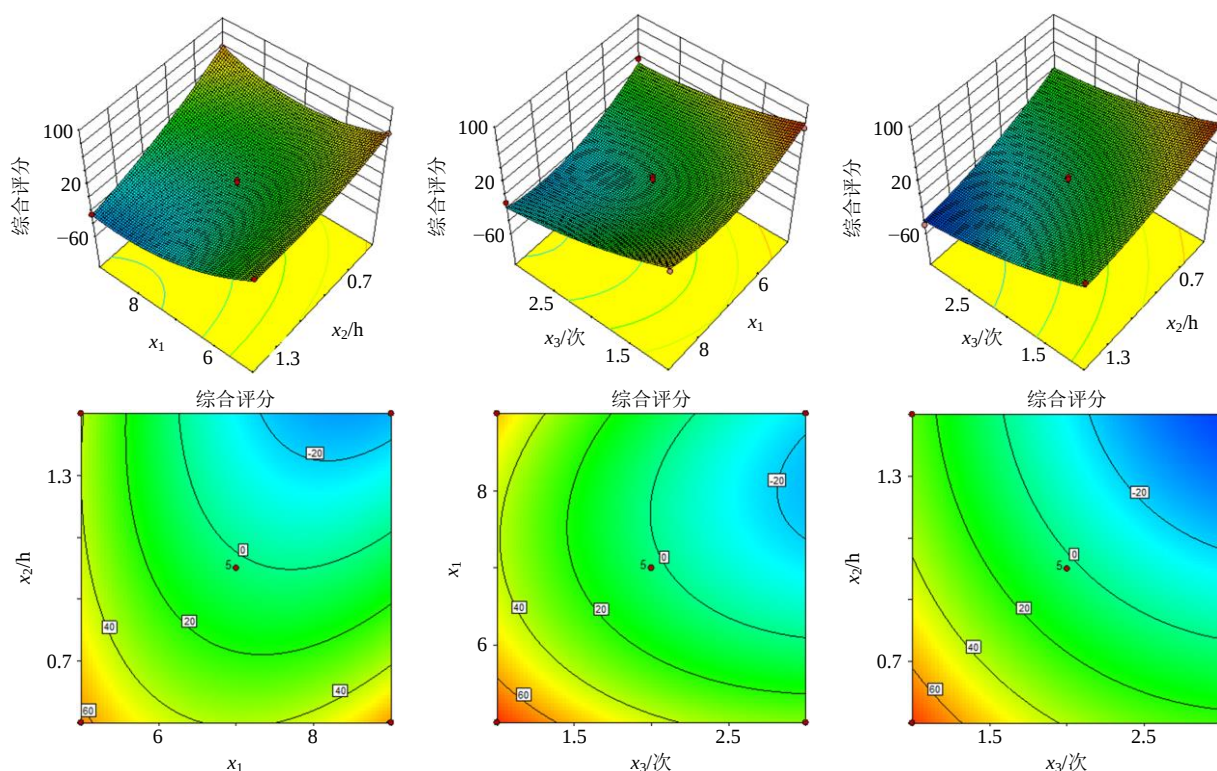


图 3 各因素 x_1 、 x_2 、 x_3 对综合评分影响的响应面及等高线图

Fig. 3 Response surface and contour map of effect of various factors x_1 , x_2 and x_3 on comprehensive score

表 11 验证试验结果

Table 11 Results of verification experiments

序号	质量分数/(mg·g ⁻¹)			出膏率/%	指纹图谱 相似度	综合评分	RSD/%
	小檗碱	黄芩苷	甘草酸铵				
1	0.291	10.330	1.999	16.61	0.925	85.27	2.09
2	0.311	10.029	1.989	16.25	0.923	88.30	
3	0.299	10.401	2.059	15.50	0.927	88.54	

中对制剂生产研究的要求。综合评分的 RSD 值为 2.09%，说明该方法确定的提取工艺稳定可靠且重复性较好。

3 讨论

BXD 作为平调寒热、散结消痞这一治法的代表方剂，在防治胃癌、急性肠胃炎、慢性胃炎等消化系统疾病方面具有显著疗效^[17-19]，极具开发价值。因此在前期确定 BXD 的处方、用法及制法等关键信息的研究基础上，课题组按照古法记载传统工艺制备标准汤液，并按国家相关规定制备基准物质，建立质量标准。

但在 BXD 的实际开发和工业生产中，无法按照古法进行提取制备，而且因为提取容器、提取方式的变化，会导致处方中成分煎出的变化，无法保证与基准物质的一致性。因此为了经典名方的开发

利用，急需建立 1 种与古法制得制剂质量一致的制备方法。

本研究以 BXD 为研究对象，严格遵循《原则》的要求^[8]，坚持 QbD 的理念，通过 Box-Behnken 试验设计试验方案。为实现现代制剂与古法制备的一致性，运用 AHP-熵权法综合评价制得制剂，将客观赋权与主观赋权相结合，综合考虑中药组方君臣佐使的原理及提取工艺对不同指标的影响后确定指标的权重系数，建立评分函数，该函数兼具全面性和系统性。同时结合 Box-Behnken 试验设计，建立函数预测模型，优化提取工艺，并对预测工艺进行验证，验证试验结果良好，且具有普遍适用性。最终确定 BXD 的现代提取工艺为加水 7 倍处方量，加热回流提取 0.5 h，提取 1 次。该提取工艺是与古法最为接近的现代提取工艺，由此确定 BXD 的现

代工艺生产参数。

基于 QbD 理念结合基准关联度和 AHP-熵权法确定权重,通过 Box-Behnken 试验设计与建模优选出的提取工艺参数稳定可靠,且对不同批次的饮片具有适用性,符合经典名方“传承精华、古为今用、古今衔接”的基本研究原则^[20],完成了 BXD 由古法制备到现代化工业生产的关键一步,为 BXD 的开发利用提供了有力支持,同时也为其他经典名方的开发利用提供参考。

志谢:研究用药材及饮片除炒甘草外均由河北外岁药业有限公司提供。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 国家中医药管理局. 关于发布《古代经典名方目录(第一批)》的通知[EB/OL]. (2018-04-17) [2021-11-04]. <http://kjs.satcm.gov.cn/zhengcewenjian/2018-04-16/7107.html>.
- [2] 张仲景. 伤寒论 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 59-60.
- [3] 崔国宁, 刘喜平, 王磊, 等. 半夏泻心汤治疗胃肠道疾病研究进展 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2019, 21(6): 87-90.
- [4] 孙丽珍, 王三虎. 王三虎活用半夏泻心汤经验探析 [J]. 中医药导报, 2019, 25(16): 131-132.
- [5] 齐赞萍, 黄延芹, 崔云竹. 半夏泻心汤治疗糖尿病胃轻瘫机制的研究进展 [J]. 中医药导报, 2022, 28(3): 143-146.
- [6] 朱俊霞, 史佩玉, 蔡向军, 等. 基于网络药理学和分子对接的半夏泻心汤治疗慢性萎缩性胃炎作用机制探讨 [J]. 药物评价研究, 2021, 44(1): 98-110.
- [7] 国家药品监督管理局. 《国家药品监督管理局综合和规划财务司关于公开征求《古代经典名方关键信息表(25 首方剂)(征求意见稿)》意见的通知》[EB/OL]. (2022-08-01). <https://www.nmpa.gov.cn/directory/web/nmpa/>

xxgk/zhqyj/zhqyjyp/20220801171436142.html.

- [8] 国家药品监督管理局药品审评中心. 《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)》[EB/OL]. (2021-08-31) [2021-11-04]. <https://www.cde.org.cn/main/news/viewInfoCommon/1c18dd163e7c9221786e5469889367d0.html>.
- [9] 毕映燕, 李俊江, 李季文, 等. 基于质量源于设计(QbD)理念的祛寒逐风颗粒制备工艺及其物理指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2021, 52(19): 5891-5898.
- [10] 代珊, 李帅, 张爱军, 等. 基于基准关联度和 AHP-熵权法综合评价经典名方小续命汤古今提取工艺 [J]. 中草药, 2022, 53(3): 726-734.
- [11] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 8, 14, 22, 88, 120, 314, 316.
- [12] 洪婷婷, 张钰明, 杨琳洁, 等. 经典名方半夏泻心汤水煎液的 HPLC 指纹图谱及黄芩、黄连量值传递研究 [J]. 中草药, 2020, 51(20): 5166-5176.
- [13] 杨艳玲, 李花花, 黄嘉怡, 等. 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 [J]. 中草药, 2022, 53(2): 403-412.
- [14] 李锐华, 孙增涛, 王永香, 等. 运用 AHP 结合熵权法优化疏风定喘颗粒炙麻黄组的醇沉工艺 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(20): 1-5.
- [15] 谢鸣. 方剂学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2017: 105.
- [16] 贾波, 李冀. 方剂学 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2014: 55.
- [17] 张成晶, 朱许丽, 张颖慧, 等. 基于寒热错杂病机中医药在胃癌各阶段防治中的研究 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2018, 24(4): 510-512.
- [18] 向长溢. 半夏泻心汤治疗急性肠胃炎的临床效果 [J]. 临床医学研究与实践, 2022, 7(6): 139-141.
- [19] 赵天池. 半夏泻心汤治疗慢性胃炎的临床疗效观察 [J]. 中国实用医药, 2021, 16(35): 183-185.
- [20] 国家中医药管理局. 关于发布《古代经典名方关键信息考证原则》《古代经典名方关键信息表(7 首方剂)》的通知 [EB/OL]. (2020-11-10) [2021-11-04]. <http://kjs.satcm.gov.cn/zhengcewenjian/2020-11-10/18132.html>.

[责任编辑 郑礼胜]