

基于 Box-Behnken 设计-响应面法与质量综合评价优化葛根芩连汤煎煮工艺

徐蓓蕾^{1,2,3}, 韩晓宇¹, 刘晶晶⁴, 张文君^{1,2,3}, 孙志伟^{1,2,3}, 胡 扬^{1,2,3}, 蔡 峥^{1,2,3}, 杨雪晶^{1,2,3}, 孙文斌¹, 杨娜娜¹, 李文兰^{1,2,3*}

1. 哈尔滨商业大学药学院, 黑龙江 哈尔滨 150076
2. 抗肿瘤天然药物教育部工程研究中心, 黑龙江 哈尔滨 150076
3. 黑龙江省预防与治疗老年性疾病药物研究重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150076
4. 中国食品药品检定研究院, 北京 100050

摘要: 目的 优化和科学评价葛根芩连汤 (Gegen Qinlian Decoction, GQD) 的煎煮工艺, 为其经典方剂中药复方制剂的研究与开发奠定基础以及提供参考。方法 以指纹图谱概貌结合多指标定量为综合评价, 采用 Box-Behnken 设计-响应面对加水量、浸泡时间、煎煮时间、煎煮次数进行优化。指纹图谱研究采用 Waters Acquity UPLC BEH C₁₈ 色谱柱 (100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm), 流动相为乙腈-0.1%甲酸水溶液 (梯度洗脱), 体积流量为 0.3 mL/min, 柱温为 35 °C, 进样量为 1 μL; 采用电喷雾离子源, 以正、负离子模式检测, 在质荷比 (*m/z*) 50~1200 进行扫描, 建立 29 批 GQD 指纹图谱并对共有峰进行指认。对图谱信息进行主成分分析, 建立 UPLC 多波长检测方法测定木兰花碱、葛根素、药根碱、巴马汀、黄芩苷、大豆苷元、黄芩素、甘草苷 8 个成分含量, 计算各样品综合得分, 优化煎煮工艺。结果 建立了 29 个试验号 GQD 样品的 UPLC-Q-TOF-MS 正、负离子模式下指纹图谱。正、负离子模式下分别有共有峰 23、19 个, 并对其指认, 指认出葛根素、大豆苷元、黄芩素、黄芩苷、巴马汀、药根碱、木兰花碱、甘草苷、甘草次酸、大豆苷、异甘草苷、汉黄芩苷、汉黄芩素、甘草酸、glyasperins D、甘草醇、绿原酸、鞣黄芩素 II。对共有峰中 8 个指标成分进行含量测定, 以计算综合得分, 综合得分结果显示, 26 号工艺为最佳工艺。最终确定 GQD 最佳煎煮工艺为加 10 倍量水, 浸泡 0.5 h, 煎煮 3 次, 每次 0.5 h。结论 所得出的 GQD 最佳煎煮工艺主要成分溶出率高, 稳定可行, 可为经典方剂 GQD 复方制剂的进一步研究和开发提供一定的依据。

关键词: 葛根芩连汤; 指纹图谱; Box-Behnken 设计-响应面法; 煎煮工艺; UPLC-Q-TOF-MS; 葛根素; 大豆苷元; 黄芩素; 黄芩苷; 巴马汀; 药根碱; 木兰花碱; 甘草苷; 甘草次酸; 大豆苷; 异甘草苷; 汉黄芩苷; 汉黄芩素; 甘草酸; glyasperins D; 甘草醇; 绿原酸; 鞣黄芩素 II

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)22-7070-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.22.010

Decoction process of Gegen Qinlian Decoction was optimized based on Box-Behnken design-response surface methodology and comprehensive quality evaluation

XU Bei-lei^{1,2,3}, HAN Xiao-yu¹, LIU Jing-jing⁴, ZHANG Wen-jun^{1,2,3}, SUN Zhi-wei^{1,2,3}, HU Yang^{1,2,3}, QI Zheng^{1,2,3}, YANG Xue-jing^{1,2,3}, SUN Wen-bin¹, YANG Na-na¹, LI Wen-lan^{1,2,3}

1. School of Pharmacy, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China
2. Engineering Research Center of Natural Anti-cancer Drugs, Ministry of Education, Harbin 150076, China
3. Heilongjiang Key Laboratory of Preventive and Therapeutic Drug Research of Senile Diseases, Harbin 150076, China
4. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China

Abstract: Objective To optimize and scientifically evaluate the decoction process of Gegen Qinlian Decoction (GQD, 葛根芩连汤) based on Box-Behnken design-response surface methodology in order to lay the foundation and provide reference for the research and development of traditional Chinese medicine compound preparations. **Methods** Taking fingerprint profile combined

收稿日期: 2022-06-15

基金项目: 黑龙江省自然科学基金联合指导计划 (LH2020H069); 哈尔滨商业大学青年学术骨干支持计划 (2020CX12)

作者简介: 徐蓓蕾 (1983—), 女, 博士, 副教授, 主要研究方向为中药药效物质与质量评价研究。Tel: 15124515866 E-mail: xubeilei2006@163.com

*通信作者: 李文兰 (1967—), 女, 博士, 教授/院长, 主要研究方向为中药药效物质与质量评价研究。Tel: 13936169153 E-mail: lwlzd@163.com

with multi-index quantification as the comprehensive evaluation, the amount of water, soaking time, decocting time and decocting times were optimized by Box-Behnken design response surface method. The fingerprint analysis was performed on a Waters Acquity UPLC BEH C₁₈ column (100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm) with mobile phase consisted of acetonitrile-0.1% formic acid aqueous solution (gradient elution) at the volume flow of 0.3 mL/min. The column temperature was 35 °C, and the injection volume was 1 μL. The fingerprints of 29 batches of GQD were established by scanning in the range of mass charge ratio (*m/z*) of 50—1200 with ESI source and detected in positive and negative ion modes, and common peaks were identified. The principal components were analyzed, and contents of 8 main components, including magnoflorine, puerarin, jatrorrhizine, palmatine, baicalin, daidzein, baicalein and liquiritin were determined by UPLC multi-wavelength detection method. And the comprehensive score of each sample was calculated to optimize the decoction process. **Results** The UPLC-Q-TOF-MS fingerprints of 29 test number of GQD samples were established in positive and negative ion mode. There were 23 and 19 common peaks in positive and negative ion mode respectively, and 18 components of them were identified, including puerarin, daidzein, baicalein, baicalin, palmatine, jatrorrhizine, magnoflorine, liquiritin, glycyrrhetic acid, daidzin, isoliquiritin, wogonoside, wogonin, glycyrrhizic acid, glyasperins D, glycyrol, chlorogenic acid and tenaxin II. The content of eight index components of the common peaks was determined to calculate the comprehensive score, and the comprehensive score results showed that test number 26 was the optimal preparation process condition. Finally, the best decoction process for GQD was determined as follows, 10 times amount of water, soaking for 0.5 h, decocting for 3 times, and each time for 0.5 h. **Conclusion** The optimal decoction technology with high dissolution rate of main components obtained by this experiment was stable and feasible, which could provide a certain basis for further research and development of the classical prescription compound preparation of GQD.

Key words: Gegen Qinlian Decoction; fingerprints; Box-Behnken design-response surface methodology; decoction technology; UPLC-Q-TOF-MS; puerarin; daidzein; baicalein; baicalin; palmatine; jatrorrhizine; magnoflorine; liquiritin; glycyrrhetic acid; daidzin; isoliquiritin; wogonoside; wogonin; glycyrrhizic acid; glyasperins D; glycyrol; chlorogenic acid; tenaxin II

葛根芩连汤 (Gegen Qinlian Decoction, GQD) 始载于张仲景《伤寒论》,由葛根、黄芩、黄连、甘草 4 味中药组成,葛根为君药,归脾胃经,解表退热散邪、养阴生津;黄芩、黄连为臣药,入大肠经,清泄胃肠里热、解毒燥湿;炙甘草甘缓和中,调佐诸药。本方以清热坚阴止利为主,兼以透表,为解表清里之剂,用于治疗太阳表邪内陷所致热下利证,是表里双解的经典方剂^[1-2]。临床常用来治疗急性肠炎、细菌性痢疾、阿米巴痢疾、小儿轮状病毒性肠炎等,现代药理学研究表明 GQD 具有抗炎、抗氧化、增强机体免疫功能等药理作用^[3-6]。课题组前期针对其治疗溃疡性结肠炎、相关结肠癌的作用机制以及药效物质进行了大量研究^[7-10]。在经典名方研究的大背景下,有必要对该方的煎煮工艺进行进一步深入探究。历代本草及文献报道中对于 GQD 煎煮工艺有过记述,葛根半斤,黄芩 3 两,黄连 3 两,炙甘草 2 两,以上 4 味,以水 8 升,先煎煮葛根,减 2 升,内诸药,煮取 2 升,去滓,分温再服。古方记述基本确定了该方现代提取工艺的部分参数,经典方剂应遵循古方原则,而在实际生产过程中,提取容器、火力大小、提取、浓缩、干燥等因素皆会影响提取工艺,从而导致质量差异,因此,如何保证现代生产工艺与古方传统工艺产品质量的一致

性,是经典名方研究成功的重点和难点问题,对于临床复方制剂质量具有重要意义^[11]。

Box-Behnken 设计-响应面法 (Box-Behnken design-response surface methodology, BBD-RSM) 是近年来广泛应用的多实验条件优化的方法,通过建立多元回归方程拟合因素和效应值之间的函数关系,以寻求最佳提取工艺参数^[12-13]。中药复方是复杂的混合物体系,UPLC-Q-TOF-MS 技术将 UPLC 对多组分样品的高分离能力与质谱高分辨率、高灵敏度的优势相结合,且能提供化合物的元素组成及离子碎片信息等特点,能够全面反映中药成分^[14-15],结合现代数理分析技术可更加全面地优化中药复方提取工艺。因此,本研究在 BBD-RSM 设计基础上,结合 UPLC-Q-TOF-MS 技术,以指纹图谱概貌、共有峰指认及含量测定结果为评价指标,对 GQD 煎煮工艺进行参数优化,可为后续中药经典方剂 GQD 研究提供实验基础。

1 仪器与材料

1.1 仪器

G7116B 6546 LC/Q-TOF 型安捷伦液相色谱,安捷伦科技(中国)有限公司;SK3310HP 型超声波清洗器,上海科导超声仪器有限公司;JM 型电子分析天平,诸暨市超泽衡器设备有限公司;001-

00S 型电热恒温鼓风干燥箱, 湖南兰思仪器有限公司; TopPette 型手动单道可调移液器, 大龙兴创实验仪器(北京)股份公司; HI1210 型水浴锅, 德国 Leica 公司。

1.2 饮片

葛根(批号 1901002, 产地陕西)、黄芩(批号 19030405, 产地安徽)、黄连(批号 19031603, 产地四川)、甘草(批号 20211222, 产地甘肃)中药饮片均购买于哈尔滨三棵树药材市场, 经哈尔滨商业大学药学院中药专业金哲雄教授鉴定, 葛根为豆科葛属植物野葛 *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi 的干燥根, 黄芩为唇形科黄芩属植物黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi 的干燥根, 黄连为毛茛科黄连属植物黄连 *Coptis chinensis* Franch. 的干燥根茎, 炙甘草为豆科甘草属植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根及根茎经蜜炙的炮制加工品, 以上饮片均符合《中国药典》2020 年版要求。

1.3 对照品及试剂

对照品葛根素(批号 111025)、大豆苷元(批号 wkq16080304)、黄芩素(批号 wkq16011504)、黄芩苷(批号 wkq16070503)、巴马汀(批号 wkq19042309)、药根碱(批号 wkq19022113)、木兰花碱(批号 140525)、甘草苷(批号 wkq16071504)均来自中国食品药品检定研究院; 屈臣氏蒸馏水, 广州屈臣氏食品饮料有限公司; 甲醇(批号 20220831)、乙腈(批号 20220731), 色谱级, 德国默克公司; 甲酸, 批号 202674, 质谱级, 美国 Fisher 公司; 娃哈哈纯净水, 杭州娃哈哈集团有限公司。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液制备

分别精密称定适量的葛根素、大豆苷元、黄芩苷、黄芩素、巴马汀、药根碱、木兰花碱、甘草苷对照品, 加入甲醇定容到 10 mL, 溶解制成质量浓度分别为 1.8、2.5、1.5、1.5、1.8、0.8、1.0、0.3 mg/mL 的混合对照品储备母液。0.22 μm 微孔滤膜滤过, 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存, 备用。

2.2 供试品溶液制备

遵循古方《伤寒论》中 GQD 的用法用量, 参照《中国药典》2020 年版一部葛根芩连片、葛根芩连丸的药物组成及比例, 确定 GQD 中葛根、黄芩、黄连、炙甘草的药味比例为 8 : 3 : 3 : 2。分别称取符合药典标准的葛根 8 g、黄芩 3 g、黄连 3 g、炙甘草 2 g, 各试验号样品按表 1 因素水平进行煎煮, 滤

过药渣, 合并滤液, 浓缩至浸膏状, 用甲醇复溶定容到 20 mL, 4000 r/min 离心(离心半径为 6.21 cm) 15 min, 取上清液过 0.22 μm 微孔滤膜, 即得供试品溶液。

2.3 BBD-RSM 因素和水平设计

课题组前期以总黄酮及总生物碱的提取率为测定指标, 分别对加水量、浸泡时间、煎煮时间、提取次数进行单因素实验, 结果见表 1~4。在此基础上, 选取加水量(X_1)、浸泡时间(X_2)、煎煮时间(X_3)、煎煮次数(X_4)为考察因素, 采用 Box-Behnken

表 1 加水量对 GQD 煎煮工艺的影响

Table 1 Effect of water addition on decoction technology of GQD

加水 量/倍	提取率/(mg·g ⁻¹)		加水 量/倍	提取率/(mg·g ⁻¹)	
	总黄酮	总生物碱		总黄酮	总生物碱
6	14.53	0.96	12	20.86	1.32
8	19.35	1.11	14	20.27	1.05
10	22.32	1.37			

表 2 浸泡时间对 GQD 煎煮工艺的影响

Table 2 Effect of soaking time on decoction technology of GQD

浸泡 时间/h	提取率/(mg·g ⁻¹)		浸泡 时间/h	提取率/(mg·g ⁻¹)	
	总黄酮	总生物碱		总黄酮	总生物碱
0	17.58	0.83	1.5	13.52	1.07
0.5	23.47	0.98	2.0	13.28	1.02
1.0	20.53	1.16			

表 3 煎煮时间对 GQD 煎煮工艺的影响

Table 3 Effect of decocting time on decoction technology of GQD

煎煮 时间/h	提取率/(mg·g ⁻¹)		煎煮 时间/h	提取率/(mg·g ⁻¹)	
	总黄酮	总生物碱		总黄酮	总生物碱
0.5	15.74	1.13	2.0	15.84	1.34
1.0	15.63	1.36	2.5	15.64	1.27
1.5	17.46	1.75			

表 4 煎煮次数对 GQD 煎煮工艺的影响

Table 4 Effect of decocting times on decoction technology of GQD

煎煮 次数	提取率/(mg·g ⁻¹)		煎煮 次数	提取率/(mg·g ⁻¹)	
	总黄酮	总生物碱		总黄酮	总生物碱
1	18.46	1.37	4	17.57	1.74
2	20.46	1.56	5	17.43	1.53
3	21.42	1.77			

设计-响应面法进行试验优化设计, 所得因素水平见表 5, 共得到 29 个试验样品。

2.4 UPLC-Q-TOF-MS 指纹图谱的建立

2.4.1 色谱条件 采用 Waters Acquity UPLC® BEH

表 5 GQD 煎煮工艺响应面试验优化设计

Table 5 Experimental design of BBD-RSM optimization of GQD

试验号	X ₁ /倍	X ₂ /h	X ₃ /h	X ₄ /次	质量浓度/(mg·mL ⁻¹)								综合得分	排名
					葛根素	大豆苷元	木兰花碱	甘草苷	黄芩素	黄芩苷	药根碱	巴马汀		
S1	10	1.0	1.0	3	2.215	0.212	0.173	0.012	0.256	0.020	0.013	0.176	0.279	8
S2	8	0.5	1.0	1	2.190	0.164	0.158	0.022	0.308	0.045	0.090	0.213	0.274	11
S3	10	0	1.5	2	0.891	0.145	0.200	0.018	0.356	0.030	0.080	0.158	0.198	21
S4	8	1.0	1.0	2	2.440	0.239	0.037	0.045	0.064	0.287	0.081	0.321	0.290	13
S5	8	0.5	1.0	3	0.167	0.467	0.199	0.017	0.403	0.047	0.045	0.217	0.259	15
S6	10	0.5	1.0	2	0.219	0.036	0.055	0.067	0.069	0.034	0.057	0.058	0.176	22
S7	8	0.5	1.5	2	1.126	0.168	0.230	0.037	0.298	0.027	0.091	0.250	0.219	18
S8	12	0.5	1.0	1	0.893	0.110	0.195	0.019	0.277	0.028	0.013	0.136	0.174	23
S9	12	0.5	0.5	2	3.282	0.410	0.067	0.346	0.147	0.096	0.079	0.135	0.351	2
S10	10	0.5	1.5	3	2.280	0.199	0.019	0.143	0.574	0.032	0.043	0.140	0.299	7
S11	10	0.5	0.5	1	0.754	0.094	0.165	0.083	0.253	0.046	0.084	0.174	0.262	14
S12	8	0	1.0	2	1.435	0.126	0.073	0.271	0.025	0.251	0.092	0.146	0.310	6
S13	10	0.5	1.0	2	0.890	0.128	0.207	0.036	0.026	0.253	0.090	0.097	0.170	24
S14	10	1.0	0.5	2	1.985	0.066	0.074	0.025	0.138	0.055	0.011	0.104	0.141	27
S15	10	0.5	1.5	1	1.985	0.194	0.119	0.010	0.016	0.287	0.099	0.177	0.278	9
S16	8	0.5	0.5	2	1.880	0.106	0.025	0.353	0.082	0.225	0.010	0.169	0.275	10
S17	10	0.5	1.0	2	2.674	0.303	0.094	0.029	0.039	0.365	0.030	0.085	0.273	12
S18	12	0.5	1.0	3	2.674	0.345	0.063	0.183	0.606	0.171	0.135	0.113	0.340	3
S19	10	0.5	1.0	2	1.065	0.229	0.217	0.032	0.125	0.051	0.022	0.041	0.156	26
S20	12	0.5	1.5	2	2.692	0.022	0.084	0.164	0.071	0.332	0.012	0.090	0.206	20
S21	10	1.0	1.5	2	2.218	0.231	0.026	0.228	0.066	0.274	0.082	0.196	0.335	4
S22	10	0	0.5	2	0.459	0.072	0.082	0.047	0.112	0.019	0.011	0.080	0.116	29
S23	12	1.0	1.0	2	1.703	0.213	0.093	0.015	0.267	0.095	0.023	0.205	0.214	19
S24	12	0	1.0	2	2.246	0.206	0.262	0.385	0.452	0.041	0.010	0.158	0.326	5
S25	10	1.0	1.0	1	0.597	0.075	0.130	0.065	0.230	0.032	0.020	0.050	0.165	25
S26	10	0.5	0.5	3	2.769	0.433	0.073	0.882	0.093	0.376	0.093	0.288	0.359	1
S27	10	0.5	1.0	2	1.347	0.087	0.083	0.014	0.038	0.211	0.012	0.186	0.253	16
S28	10	0	1.0	3	0.772	0.041	0.108	0.111	0.076	0.086	0.092	0.204	0.244	17
S29	10	0	1.0	1	0.521	0.082	0.090	0.047	0.166	0.011	0.011	0.064	0.139	28

C₁₈ 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm); 保护柱 Waters Acquity UPLC® BEH C₁₈ (50 mm×2.1 mm, 1.7 μm); 流动相为 0.1% 甲酸水溶液-乙腈, 梯度洗脱: 0 min, 5% 乙腈; 0~5 min, 5%~10% 乙腈; 5~10 min, 10%~12% 乙腈; 10~17 min, 12%~22% 乙腈; 17~20 min, 22%~29% 乙腈; 20~25 min, 29%~80% 乙腈; 25~27 min, 80%~95% 乙腈; 27~28 min, 95% 乙腈; 体积流量 0.3 mL/min; 柱温

35 °C; 进样量 1 μL。

2.4.2 质谱条件 离子源为电喷雾离子源 (ESI); 采用正、负离子采集模式; 毛细管电压 3 kV, 雾化器气体 650 kPa (6.5 bar), 锥形电压 35 kV, 锥形气体体积流量 50 L/h, 去溶剂气温度 350 °C, 去溶剂气体体积流量 700 L/h, 源温度 180 °C。

2.4.3 精密度试验 称取试验号 17 样品, 按照“2.2”项下方法制得供试品溶液, 按照“2.4.1”项下色谱

条件进行检测,连续进样 6 次,记录谱图,选择出峰较稳定、响应值较高、峰面积较大的药根碱为参照峰,各共有峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 分别小于 2.00%、2.17%,表明本方法精密度高。

2.4.4 稳定性试验 称取试验号 17 样品,按照“2.2”项下方法制得供试品溶液,按照“2.4.1”项下色谱条件进行检测,分别于 0、4、8、12、16、20、24 h 进样,记录谱图。选择出峰较稳定、响应值较高、峰面积较大的药根碱为参照峰,各共有峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 分别小于 1.97%、2.00%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.4.5 重复性试验 平行制备试验号 17 样品 6 份,按照“2.2”项下方法制得供试品溶液,分别按照“2.4.1”项下色谱条件进行检测,记录谱图。选择出峰较稳定、响应值较高、峰面积较大的药根碱为参照峰,各共有峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 分别小于 2.26%、2.83%,表明本方法重复性良好。

2.4.6 指纹图谱分析 分别称取 29 个试验号样品,按照“2.2”项下方法制得供试品溶液,分别按照“2.4.1”“2.4.2”项下色谱条件和质谱条件进行检测,得到 29 个试验号样品 UPLC-Q-TOF-MS 正、负离子模式下总离子流图(total ion chromatogram, TIC),见图 1、2。将谱图导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004A 版”进行分析。分别确定了正、负离子模式下出峰明显、重复性良好、保留时间稳定

的共有峰 23、19 个(R 为对照图谱),依据相对分子质量、主要离子碎片等信息对共有峰进行指认,指认结果如表 6 所示。

2.4.7 主成分分析(principal component analysis, PCA) 将 GQD 样品正、负离子模式下指纹图谱的共有峰峰面积分别导入 SPSS 20.0 软件,进行 PCA,正离子模式下 PCA 结果见表 7 和图 3-A;负离子模式下 PCA 结果见表 8 和图 3-B。主成分特征值、累积方差贡献率以特征值 > 1 为提取标准,正离子模式下共提取出 8 个主成分,得到主成分的累积方差贡献率 78.57%;负离子模式下共提取出 5 个主成分,得到主成分的累积方差贡献率为 72.611%;能够代表样品中成分的大部分信息。

从表 9 中可以看出根据因子载荷矩阵,在主成分 1 中,除了 1~3、8 号色谱峰以外,其余 19 个成分的因子载荷非常接近,均是主成分 1 的重要贡献成分,说明正离子模式下主成分 1 很好地表达了 GQD 多成分物质群。

从表 10 中可以看出根据因子载荷矩阵,在主成分 1 中,除了 9、19 号色谱峰以外,其余 17 个成分的因子载荷非常接近,均是主成分 1 的重要贡献成分,说明负离子模式下主成分 1 很好地表达了 GQD 多成分物质群。

2.5 GQD 多成分含量测定研究

2.5.1 样品测定 在共有峰指认和 PCA 的基础上

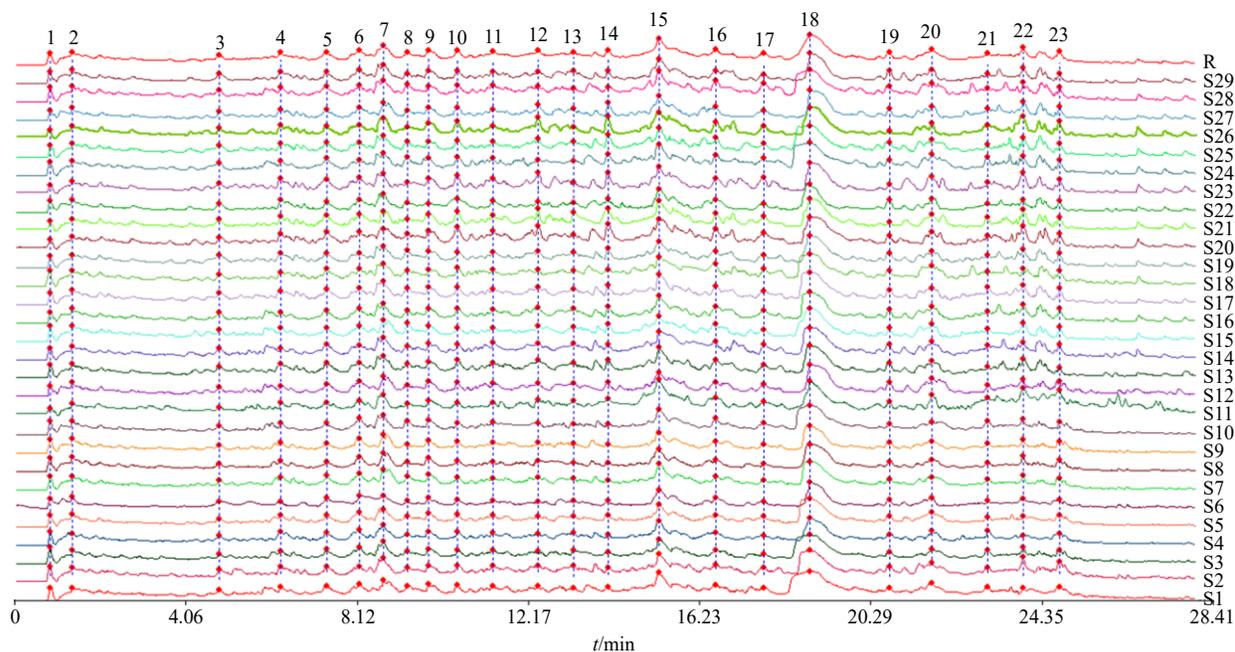


图 1 29 批 GQD 样品叠加图谱(正离子模式)

Fig. 1 Chromatogram of 29 batches of GQD samples (positive ion mode)

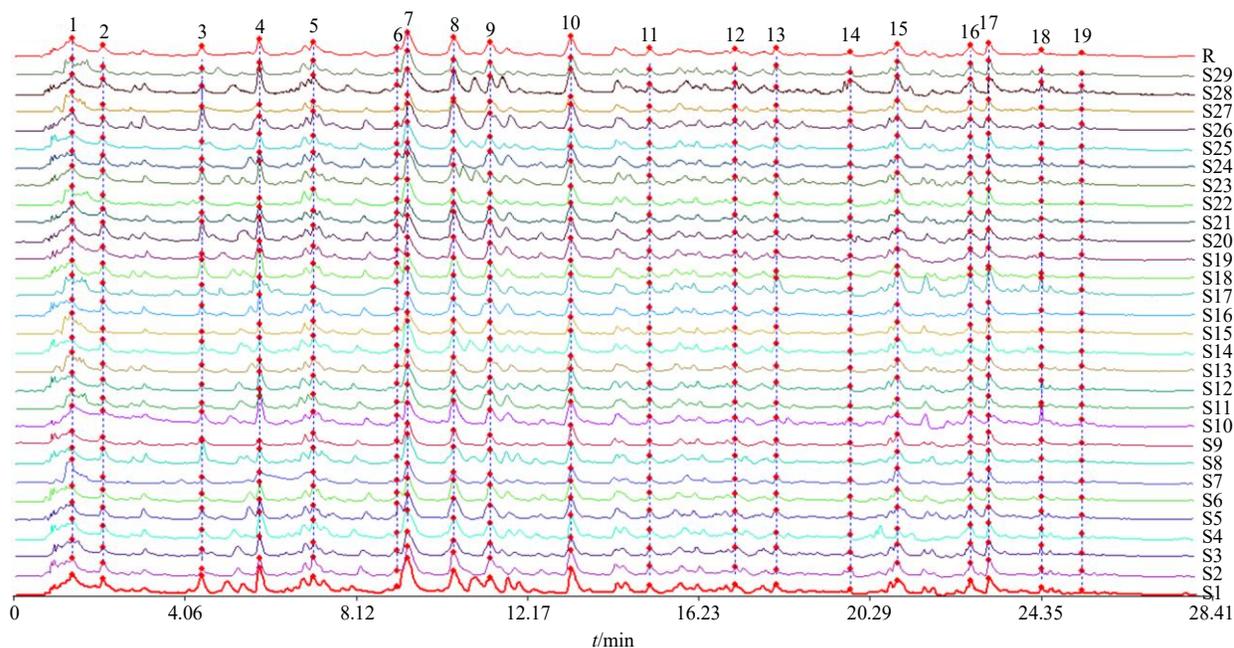


图 2 29 批 GQD 样品叠加图谱 (负离子模式)

Fig. 2 Chromatogram of 29 batches of GQD samples (negative ion mode)

表 6 GQD 共有峰指认结果

Table 6 Identify results of GQD common peak

峰号	分子式	离子模式	检测值(m/z)	理论值(m/z)	碎片离子	误差($\times 10^{-6}$)	鉴别结果
4	C ₃₀ H ₄₆ O ₄	[M+H] ⁺	471.346 9	471.345 1	371.148 4, 303.082 8	3.82	甘草次酸
10	C ₂₁ H ₂₀ O ₉	[M+H] ⁺	417.118 3	417.116 9	255.064 3	3.36	大豆苷
11	C ₂₁ H ₂₂ O ₉	[M+H] ⁺	419.132 7	419.132 5	257.080 5	0.48	异甘草苷
16	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	[M+H] ⁺	271.060 2	271.059 5	253.154 3	0.89	黄芩素
17	C ₂₁ H ₂₀ O ₉	[M+H] ⁺	417.118 3	417.117 1	399.107 0, 381.094 4, 351.087 0	2.98	葛根素
18	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	[M+H] ⁺	255.065 0	255.064 5	199.074 0	0.95	大豆苷元
19	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁	[M+H] ⁺	447.092 3	447.090 2	271.059 8	4.37	黄芩苷
20	C ₂₂ H ₂₀ O ₁₁	[M+H] ⁺	461.108 1	461.106 9	285.075 8	2.60	汉黄芩苷
21	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	[M+H] ⁺	285.075 9	285.075 2	270.242 5	1.57	汉黄芩素
22	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₆	[M+H] ⁺	823.410 3	823.409 2	647.373 0, 453.335 5	3.83	甘草酸
23	C ₂₂ H ₂₆ O ₅	[M+H] ⁺	371.188 4	371.184 2	303.082 8	11.32	glyasperins D
2	C ₂₁ H ₁₈ O ₆	[M-H] ⁻	367.113 8	367.116 6	339.877 7	-0.86	甘草醇
3	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	[M-H] ⁻	353.087 8	353.087 0	191.055 6, 179.034 3	2.56	绿原酸
12	C ₂₁ H ₂₂ O ₉	[M-H] ⁻	441.115 6	441.114 4	321.114 7	3.80	甘草苷
14	C ₂₀ H ₂₀ NO ₄	[M-H] ⁻	338.137 6	338.137 8	292.092 8	-0.78	药根碱
15	C ₂₁ H ₂₂ NO ₄	[M-H] ⁻	352.154 7	352.152 3	337.131 0, 308.130 0	6.82	巴马汀
17	C ₂₀ H ₂₄ NO ₄	[M-H] ⁻	341.066 2	342.169 1	297.077 9	32.20	木兰碱
19	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	[M-H] ⁻	301.070 7	301.069 8	283.023 3	2.99	芴黄芩素 II

对 29 个试验号样品中 8 个共有成分指认并进行含量测定。如图 4 所示, 分别在 254 nm (葛根素、大豆苷元)、270 nm (黄芩苷、黄芩素、木兰花碱、甘草苷)、345 nm (巴马汀、药根碱) 波长下对相应

成分进行测定。色谱条件同“2.4.1”项下。

2.5.2 线性关系考察 精密量取“2.1”项下制备的对照品储备液, 用甲醇通过 2 倍稀释法分别稀释 2、4、8、16、32 倍, 制得各质量浓度的混合对照品溶

表 7 主成分初始特征值和累积方差贡献率 (正离子模式)

Table 7 Initial eigenvalue and contribution rate of principal components (positive ion mode)

主成分	特征值	方差贡献率/%	累积方差贡献率/%	主成分	特征值	方差贡献率/%	累积方差贡献率/%	主成分	特征值	方差贡献率/%	累积方差贡献率/%
1	4.875	21.197	21.197	9	0.892	3.880	82.450	17	0.167	0.724	97.941
2	3.706	16.115	37.311	10	0.808	3.513	85.963	18	0.140	0.607	98.548
3	2.814	12.234	49.545	11	0.718	3.121	89.085	19	0.115	0.501	99.049
4	1.826	7.937	57.482	12	0.572	2.489	91.574	20	0.091	0.394	99.443
5	1.497	6.509	63.991	13	0.436	1.895	93.468	21	0.065	0.283	99.726
6	1.288	5.601	69.592	14	0.334	1.451	94.920	22	0.041	0.180	99.905
7	1.060	4.609	74.201	15	0.284	1.236	96.155	23	0.022	0.095	100.000
8	1.005	4.369	78.570	16	0.244	1.062	97.217				

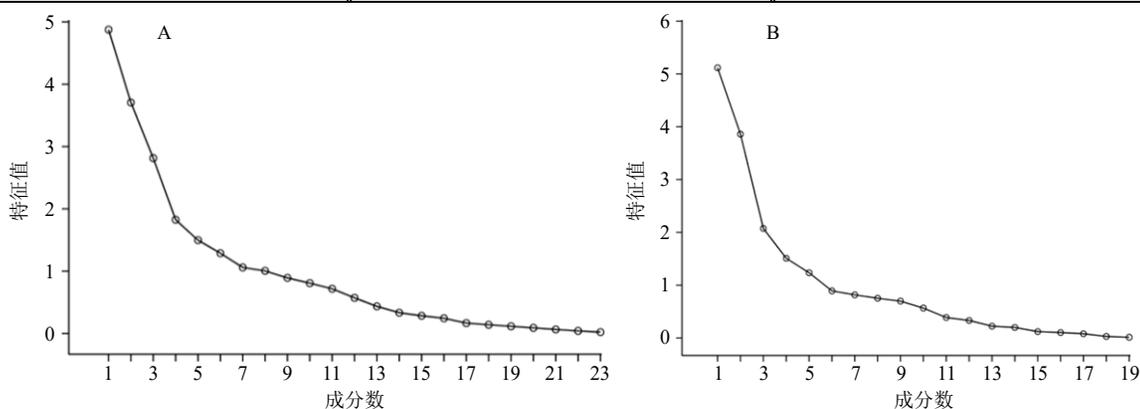


图 3 正离子模式 (A) 和负离子模式 (B) 下 PCA 碎石图

Fig. 3 Gravel diagram of PCA in positive ion mode (A) and negative ion mode (B)

表 8 主成分初始特征值和累积方差贡献率 (负离子模式)

Table 8 Initial eigenvalue and contribution rate of principal components (negative ion mode)

主成分	特征值	方差贡献率/%	累积方差贡献率/%	主成分	特征值	方差贡献率/%	累积方差贡献率/%	主成分	特征值	方差贡献率/%	累积方差贡献率/%
1	5.117	26.932	26.932	8	0.751	3.952	85.553	15	0.120	0.632	98.829
2	3.860	20.314	47.246	9	0.698	3.671	89.224	16	0.102	0.536	99.365
3	2.075	10.919	58.165	10	0.566	2.977	92.202	17	0.079	0.418	99.783
4	1.509	7.942	66.107	11	0.387	2.036	94.237	18	0.028	0.149	99.932
5	1.236	6.503	72.611	12	0.332	1.745	95.982	19	0.013	0.068	100.000
6	0.892	4.695	77.305	13	0.222	1.171	97.153				
7	0.816	4.296	81.601	14	0.198	1.044	98.197				

液, 分别按照“2.5.1”项下条件进行测定, 记录峰面积。以质量浓度为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y) 进行线性回归, 得各成分的回归方程分别为木兰花碱 $Y=32\ 917 X+765.76$, $r=0.999\ 0$, 线性范围 $0.071\sim 1.510\ \text{mg/mL}$; 葛根素 $Y=18\ 077 X+246.57$, $r=0.999\ 3$, 线性范围 $0.020\sim 2.240\ \text{mg/mL}$; 药根碱 $Y=93\ 737 X+1646.8$, $r=0.999\ 7$, 线性范围 $0.010\sim 0.150\ \text{mg/mL}$; 巴马汀 $Y=20\ 535 X-$

387.09 , $r=0.999\ 5$, 线性范围 $0.040\sim 1.370\ \text{mg/mL}$; 黄芩苷 $Y=46\ 102 X+2299$, $r=0.999\ 3$, 线性范围 $0.020\sim 1.720\ \text{mg/mL}$; 大豆苷元 $Y=87\ 047 X+58.59$, $r=0.999\ 6$, 线性范围 $0.006\sim 0.600\ \text{mg/mL}$; 黄芩素 $Y=50\ 810 X+294.76$, $r=0.999\ 3$, 线性范围 $0.004\sim 0.500\ \text{mg/mL}$; 甘草苷 $Y=23\ 347 X+2\ 042.6$, $r=0.999\ 2$, 线性范围 $0.060\sim 0.180\ \text{mg/mL}$ 。

2.5.3 精密度试验 按试验号 17 的制备方法制备

表 9 成分得分系数矩阵 (正离子模式)

Table 9 Component score coefficient matrix (positive ion mode)

成分 (峰号)	主成分								成分 (峰号)	主成分							
	1	2	3	4	5	6	7	8		1	2	3	4	5	6	7	8
1	-0.107	0.071	0.165	0.072	0.105	0.250	-0.044	0.118	13	0.084	0.000	-0.086	0.361	0.015	0.222	0.277	0.117
2	-0.041	0.160	0.066	-0.094	0.208	0.079	0.186	-0.504	14	0.143	-0.047	0.128	0.005	-0.076	0.024	0.190	-0.016
3	-0.024	0.029	0.142	0.332	0.282	-0.199	-0.197	0.003	15	0.122	-0.055	-0.140	0.010	0.236	-0.160	-0.220	0.162
4	0.017	0.177	-0.135	-0.137	-0.016	-0.042	0.393	-0.007	16	0.115	-0.042	-0.102	-0.051	0.283	-0.183	0.402	0.281
5	0.056	0.184	0.010	0.157	-0.105	-0.219	-0.065	-0.065	17	0.162	-0.048	0.084	-0.112	-0.068	-0.109	-0.181	0.004
6	0.022	0.162	-0.175	0.114	-0.187	-0.086	-0.058	0.094	18	0.085	0.100	0.126	-0.263	-0.178	0.219	0.021	0.078
7	0.023	0.075	-0.144	0.170	-0.088	0.371	-0.357	0.017	19	0.038	0.165	0.055	-0.117	-0.018	-0.322	-0.354	0.129
8	-0.048	0.185	0.064	-0.021	0.247	0.060	0.014	0.264	20	0.007	0.185	-0.079	0.099	-0.008	-0.186	0.123	-0.157
9	0.111	0.055	-0.134	-0.215	0.025	0.118	-0.210	-0.066	21	0.038	0.037	0.192	0.111	-0.313	-0.028	0.158	0.436
10	0.153	-0.052	0.115	-0.004	0.257	0.047	-0.066	-0.115	22	0.124	-0.003	0.178	0.128	-0.182	-0.162	0.080	-0.324
11	0.136	0.077	-0.021	-0.011	0.107	0.238	-0.032	0.226	23	0.027	0.114	0.204	-0.045	0.176	0.153	-0.005	0.084
12	0.151	0.018	-0.047	0.150	-0.009	0.196	-0.018	-0.327									

表 10 成分得分系数矩阵 (负离子模式)

Table 10 Component score coefficient matrix (negative ion mode)

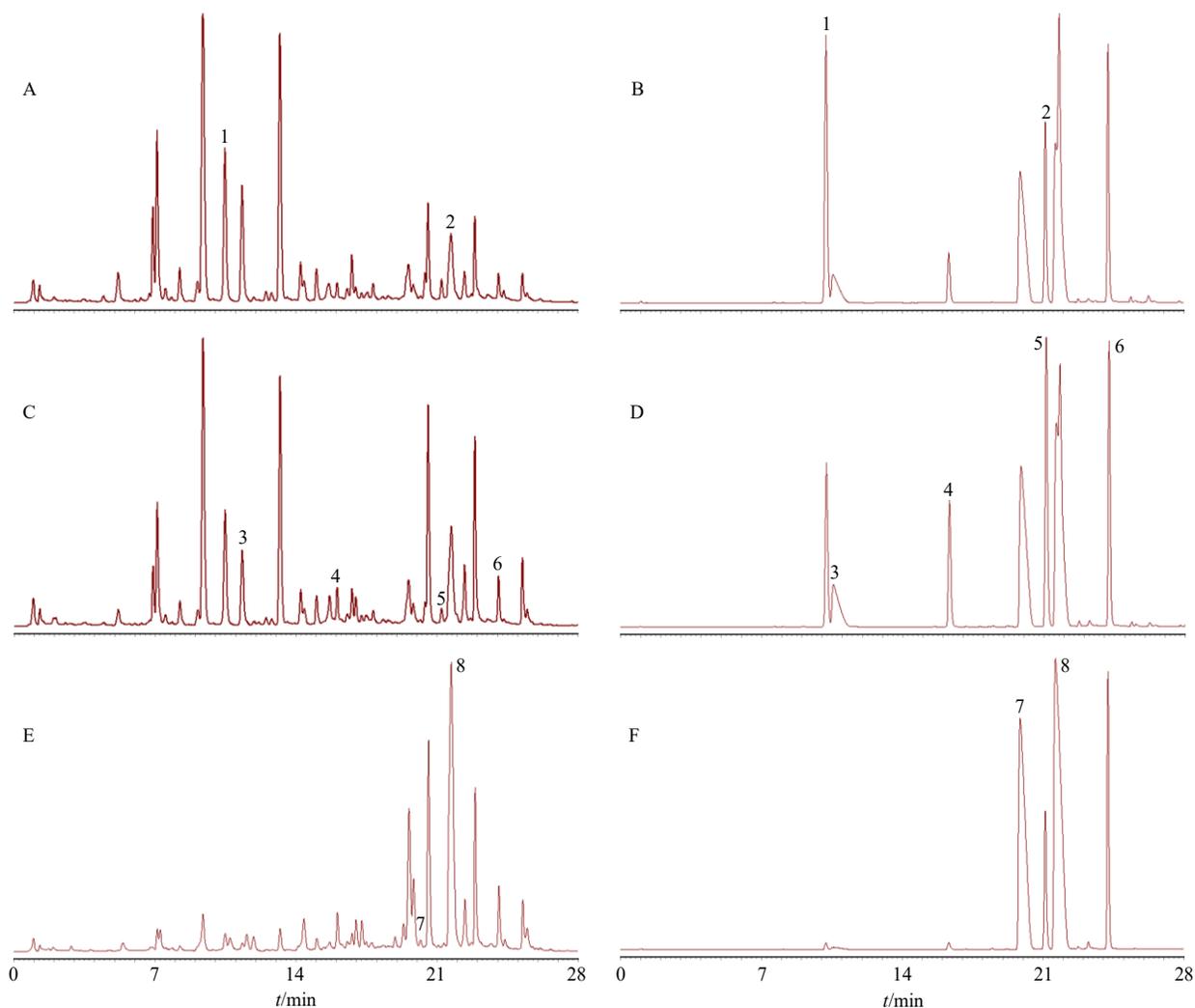
成分 (峰号)	成分					成分 (峰号)	成分					成分 (峰号)	成分				
	1	2	3	4	5		1	2	3	4	5		1	2	3	4	5
1	0.018	0.080	-0.357	0.120	0.226	8	0.019	0.216	0.125	-0.129	0.139	15	0.111	-0.152	0.020	0.045	0.057
2	0.067	0.146	-0.225	0.281	0.049	9	0.009	0.184	0.191	0.152	-0.149	16	0.175	-0.052	-0.004	-0.066	-0.056
3	0.031	0.182	-0.094	0.252	-0.238	10	0.138	0.060	-0.077	-0.225	0.028	17	0.172	-0.053	-0.013	-0.001	-0.059
4	0.062	0.158	0.010	-0.230	0.108	11	0.08	0.073	0.262	0.148	0.124	18	0.121	-0.024	0.074	0.355	-0.295
5	0.067	0.163	0.034	-0.256	-0.110	12	0.087	-0.035	-0.013	-0.172	-0.365	19	-0.037	0.048	0.343	0.080	0.326
6	0.082	-0.040	0.182	0.141	-0.163	13	0.116	-0.033	-0.053	0.233	0.460						
7	0.155	0.058	-0.037	-0.167	0.105	14	0.123	-0.136	0.078	-0.068	0.181						

供试品溶液,按照“2.5.1”项下色谱条件,连续进样 6 次,记录各成分色谱峰峰面积,计算其 RSD。结果木兰花碱、葛根素、药根碱、巴马汀、黄芩苷、大豆苷元、黄芩素、甘草苷峰面积的 RSD 分别为 1.97%、0.95%、1.64%、1.75%、1.56%、2.15%、1.46%、1.55%,表明仪器精密度良好。

2.5.4 稳定性试验 按试验号 17 的制备方法制备供试品溶液,室温放置,分别在制备后 0、4、8、12、16、20、24 h 时,按照“2.5.1”项下色谱条件测定,记录各成分色谱峰峰面积,计算其峰面积的 RSD。结果木兰花碱、葛根素、药根碱、巴马汀、黄芩苷、大豆苷元、黄芩素、甘草苷峰面积的 RSD 分别为 1.65%、1.86%、2.41%、2.18%、1.74%、2.55%、1.86%、1.39%,表明供试品溶液在室温放置 24 h 内稳定性良好。

2.5.5 重复性试验 按试验号 17 的制备方法平行制备 6 份供试品溶液,按照“2.5.1”项下色谱条件测定,记录各成分色谱峰峰面积,计算各组分峰面积的 RSD。结果木兰花碱、葛根素、药根碱、巴马汀、黄芩苷、大豆苷元、黄芩素、甘草苷的峰面积 RSD 分别为 1.45%、1.23%、1.72%、1.63%、1.64%、1.53%、1.28%、1.46%,表明该方法重复性良好。

2.5.6 加样回收率试验 按试验号 17 的制备方法制备 6 份供试品溶液,每份称取 1 mL,分别精密加入 8 种对照品适量,按照“2.5.1”项下色谱条件测定,记录各组分色谱峰峰面积,计算各成分加样回收率及其峰面积的 RSD。结果木兰花碱、葛根素、药根碱、巴马汀、黄芩苷、大豆苷元、黄芩素、甘草苷的平均加样回收率分别为 99.2%、99.0%、98.7%、98.6%、99.3%、99.5%、98.5%、99.4%,峰



1-葛根素 2-大豆苷元 3-木兰花碱 4-甘草苷 5-黄芩素 6-黄芩苷 7-药根碱 8-巴马汀 A、C、E 分别为 254、270、345 nm 波长下 GQD 样品图谱 B、D、F 分别为 254、270、345 nm 波长下混合对照品图谱
1-puerarin 2-daidzein 3-magnolin 4-liquiritin 5-baicalein 6-Baicalin 7-jatrorrhizine 8-palmatine A, C, E are GQD sample chromatograms at 254, 270, 345 nm, respectively B, D, F are mixed reference substance chromatograms at 254, 270, 345 nm, respectively

图 4 GQD 样品和对照品溶液的 UPLC 图

Fig. 4 UPLC chromatograms of GQD samples and reference substance solutions

面积 RSD 分别为 1.37%、1.33%、1.47%、1.38%、1.14%、1.5%、1.33%、1.27%。

2.5.7 多指标含量测定评价结果 计算各成分含量测定结果，并赋予 8 成分相同权重（8 成分分别为 4 味药的核心代表性成分，赋予相同权重），以综合评分进行评价^[13]，综合评分 = $(X_1/X_{\max} + X_2/X_{\max} + X_3/X_{\max} + X_4/X_{\max} + X_5/X_{\max} + X_6/X_{\max} + X_7/X_{\max} + X_8/X_{\max})/8$ ，如表 5 所示。综合得分结果显示 26 号工艺为最佳工艺。

2.6 BBD-RSM 回归模型的建立及分析

采用 Design Expert 10 软件，通过响应面法进行工艺优化。分别对各因素水平进行多元线性和非线性回归，建立各指标综合评分 (Y) 对 4 个因素 (X_1 、

X_2 、 X_3 、 X_4) 的回归方程模型 $Y = 8.42 - 1.35 X_1 - 0.28 X_2 - 0.26 X_3 - 1.42 X_4 - 0.09 X_1 X_2 - 0.10 X_1 X_3 + 0.11 X_1 X_4 + 0.71 X_2 X_3 + 0.10 X_2 X_4 - 0.24 X_3 X_4 + 0.06 X_1^2 + 0.28 X_2^2 + 0.63 X_3^2 + 0.16 X_4^2$ ，相关系数 $r = 0.8865$ ，校正系数 0.8704，说明该模型拟合度良好，试验误差小，可用此模型对综合评分进行分析和预测。根据软件拟合得到回归方程等高线及响应面图，评价试验因素之间的交互强度，来确定最佳煎煮工艺参数。通过等高线的形状反映交互效应的强弱，椭圆表示交互作用强，圆形则交互作用较弱，结果见图 5。根据模型拟合结果，加水量 8.9 倍、浸泡时间 0.57 h、煎煮时间 0.81 h、煎煮次数 2.75 次。

因此，以本实验中 BBD-RSM 设计为依据，整

合指纹图谱、化学模式识别以及多指标含量测定结果，从煎煮及后续生产工艺实际情况出发，并参考 GQD 经典名方制备工艺，本着成本节约及最大限度提取有效成分的原则，最终确定 GQD 最佳工艺为 10 倍量水、浸泡 0.5 h、煎煮 0.5 h、煎煮 3 次。

2.7 工艺验证实验

选择最佳煎煮工艺条件（加 10 倍量水，浸泡 0.5 h，煎煮 3 次，每次 0.5 h）进行 3 次验证试验，

按上述方法进行指纹图谱和含量测定，计算得到指纹图谱相似度分别为 0.983、0.992、0.987，3 次验证样品含量测定的综合得分如表 11 所示，与最佳工艺所得样品综合评分基本吻合，说明优化得到的提取工艺条件较为稳定可行。

3 讨论

提取工艺是中药复方药效物质与质量控制领域的核心环节，优化中药复方提取工艺参数，是高效

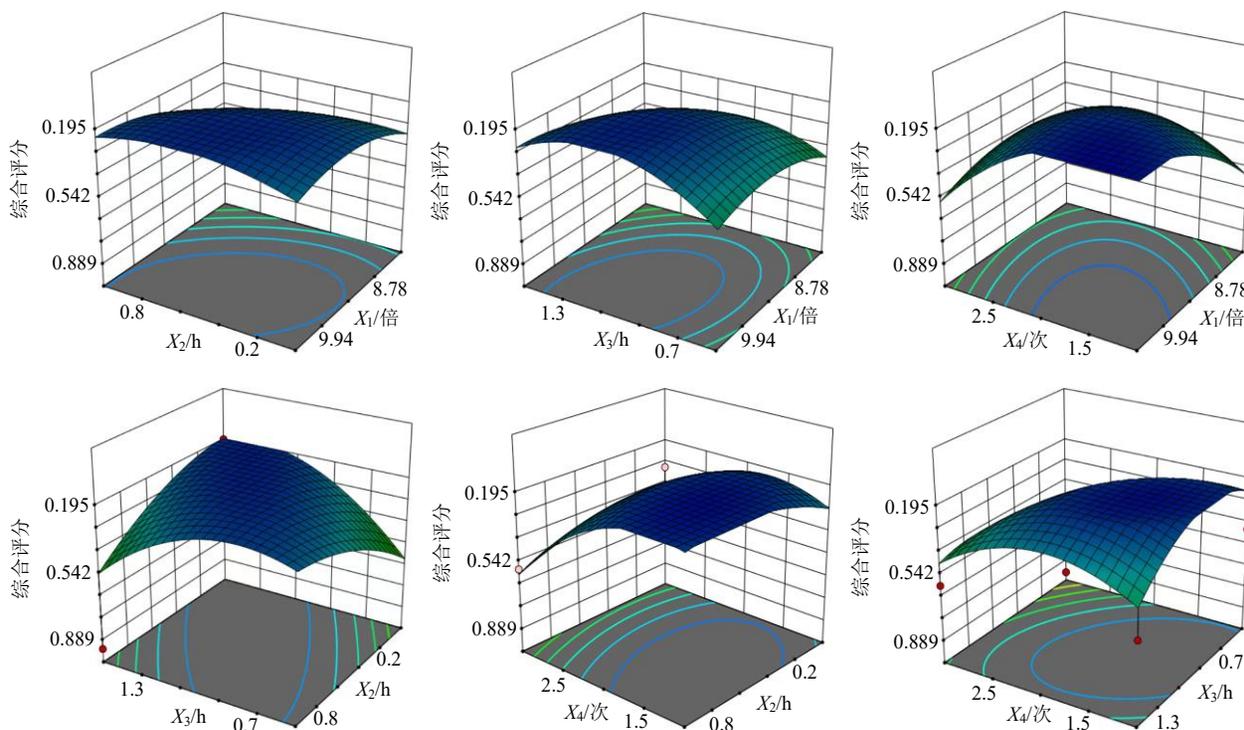


图 5 4 因素对综合评分的响应面图

Fig. 5 Response surface of four factors to comprehensive score

表 11 验证实验结果

Table 11 Verification test results

试验号	质量浓度 (mg·mL ⁻¹)								综合得分
	木兰花碱	葛根素	药根碱	巴马汀	黄芩苷	大豆苷元	黄芩素	甘草苷	
1	0.173	2.769	0.193	0.288	0.376	0.733	0.192	0.882	0.377
2	0.136	2.457	0.152	0.227	0.297	0.578	0.151	0.696	0.349
3	0.161	2.583	0.180	0.269	0.350	0.684	0.179	0.823	0.355

充分提取药效物质，保障临床有效性的前提，也是影响中药制剂质量的关键因素。古方记载 GQD 用法为葛根、黄芩、黄连、炙甘草，上四味，以水八升，先煮葛根，减两升，内诸药，煮取二升，去滓，分温再服。因现代煎煮工具、条件、技术手段与古代相去甚远，导致现代煎煮工艺与古法记载存在一定差异^[11,16]。遵循古方优化现代煎煮工艺参数成为经典名方研究的重中之重环节。本研究依据刘昌孝

院士提出的“传承不泥古，创新不离宗，论证以求真”的基本科研精神，参照古籍记载，综合考虑现代提取工艺的实际情况，最终优化 GQD 煎煮工艺。模型拟合结果得到的最佳工艺为加水量 8.9 倍、浸泡时间 0.57 h、煎煮时间 0.81 h、煎煮次数 2.75 次。结合煎煮工艺的实际情况以及研究过程中指纹图谱和化学模式识别多指标含量测定结果得到并确定 GQD 最佳工艺。

课题组前期预实验研究发现,加水量、浸泡时间、煎煮时间、煎煮次数对 GQD 的提取工艺有较大影响,其中煎煮次数是对复方提取质量影响最大的因素。在此基础上,本研究采用 BBD-RSM 设计对 GQD 提取工艺的加水量、浸泡时间、煎煮时间、煎煮次数进行优化,结合 UPLC-Q-TOF-MS 指纹图谱概貌分析与多指标成分综合评价分析,确定了 GQD 最佳煎煮工艺。

BBD-RSM 设计法近年来广泛应用于经典中药复方提取工艺研究^[17-19],是一种通过建立多元回归方程拟合因素和效应值之间的函数关系寻求最佳提取工艺参数的设计方法^[20],将响应面设计法应用于古方提取工艺研究相比于正交试验更简化,相对于均匀设计更全面^[21],能够有效减少试验次数,操作起来更高效同时更节约试验成本。运用现代分析技术 UPLC-Q-TOF-MS 构建中药复方 GQD 的指纹图谱,方法精密度、稳定性良好,并依据分子量和离子碎片信息等对正、负离子模式下的共有峰分别进行指认,可以更加精准更加全面地反映 GQD 全成分及主要成分的信息^[22-23]。《中国药典》2020 年版要求葛根芩连方中只对葛根素、盐酸小檗碱、黄芩苷 3 个成分进行定量分析,本实验建立了 GQD 不同煎煮工艺指纹图谱,结合主成分分析,选择分离良好,峰形稳定,峰面积较大、易于定量的共有峰所对应的 8 个成分作为指标成分定量分析^[24-25],设计质量综合评分。

相较于传统提取工艺在中药生产过程中的局限性,基于现代设计手段的提取工艺研究优势逐渐突显,在遵古而不泥古的原则下,明显提高了提取效率,节约资源,节省时间^[26-27],本实验首次基于 BBD-RSM 设计,结合 UPLC-Q-TOF-MS 指纹图谱概貌分析与多指标成分质量综合评价优化 GQD 最佳现代煎煮工艺,UPLC-Q-TOF-MS 能更加准确全面地从定性角度反映 GQD 全成分信息,通过共有峰指认、主成分分析以及在此基础上所展开的关键指标成分含量测定,做到从“定性”和“定量”2 个角度综合优化 GQD 煎煮工艺。所得提取工艺缩短了煎煮时间,简化操作,有利于药效物质的提取,是 GQD 更为高效的提取工艺,避免了不必要的中药资源浪费,为经典方剂 GQD 的进一步研究与开发提供物质基础参考和依据,为保障临床药效奠定基础^[28]。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 任伟光,郭丽丽,张翠英.葛根芩连汤的研究进展及质量标志物的预测分析[J].中国新药杂志,2021,30(18):1675-1679.
- [2] 陈丽红,唐于平,王强.葛根芩连汤的现代研究进展[J].中草药,2010,41(4):676-680.
- [3] 滕健.葛根芩连汤方证研究[D].北京:北京中医药大学,2012.
- [4] 刘莲萱,吴威,庞琳琳,等.葛根芩连汤化学成分、药理作用及临床应用研究进展[J].中华中医药学刊,2022,40(3):147-154.
- [5] 曾滢仪.基于数据挖掘的葛根芩连汤方证研究[D].北京:北京中医药大学,2017.
- [6] 孙婷,李新民,孙丹,等.基于整合药理学平台研究葛根芩连汤治疗小儿肺炎的作用机制[J].药物评价研究,2019,42(1):78-83.
- [7] 徐蓓蕾,张贵君,崔向微,等.葛根芩连汤药效组分抑菌生物效价测定[J].中华中医药杂志,2013,28(1):230-233.
- [8] Xu B L, Zhang G J, Ji Y B. Active components alignment of Gegenqinlian Decoction protects ulcerative colitis by attenuating inflammatory and oxidative stress [J]. *J Ethnopharmacol*, 2015, 162: 253-260.
- [9] 徐蓓蕾,吴迪,杨娜娜,等.基于“通路-疾病”交互网络的葛根芩连汤及其指标成分组合物干预小鼠溃疡性结肠炎相关结肠癌的作用[J].中草药,2020,51(19):4991-4998.
- [10] Xu B L, Li P Y, Zhang G J. Comparative pharmacokinetics of puerarin, daidzin, baicalin, glycyrrhizic acid, liquiritin, berberine, palmatine and jateorhizine by liquid chromatography-mass spectrometry after oral administration of Gegenqinlian Decoction and active components alignment (ACA) to rats [J]. *J Chromatogr B*, 2015, 988: 33-44.
- [11] 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.
- [12] 栗焕焕,毛营营,张国琴,等.响应面分析法优化吴茱萸提取工艺及多指标定量指纹图谱研究[J].中华中医药杂志,2020,35(11):5716-5720.
- [13] 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.
- [14] 陈明曦,李艳梅,孙婷,等.液相色谱-质谱联用技术在中药质量研究中的应用[J].中国药理学杂志,2021,19(1):12-17.
- [15] Yu Y, Yao C L, Guo D A. Insight into chemical basis of traditional Chinese medicine based on the state-of-the-art

- techniques of liquid chromatography-mass spectrometry [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2021, 11(6): 1469-1492.
- [16] 文谨, 刘起华, 章军, 等. 葛根芩连汤煮散煎煮工艺优化 [J]. *中成药*, 2016, 38(9): 2070-2073.
- [17] 王蕊娇, 张育龙, 董培良, 等. 基于 Box-Behnken 设计和主成分分析法研究当归-苦参药对的提取工艺及不同比例配伍对急性心肌缺血大鼠的影响 [J]. *中草药*, 2022, 53(12): 3632-3642.
- [18] 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.
- [19] 吴振起, 高畅, 杨璐, 等. 基于层次分析法结合 Box-Behnken 设计-响应面法优选养阴清肺汤加味提取工艺 [J]. *中草药*, 2019, 50(12): 2862-2867.
- [20] 宋佳, 黄飞龙, 段树卿, 等. Plackett-Burman 设计联合 Box-Behnken 设计-效应面法优化心神宁片的提取工艺 [J]. *中草药*, 2016, 47(3): 430-435.
- [21] 王萍, 王宇鹤, 许刚, 等. 大叶秦艽总环烯醚萜苷 3 种提取工艺优化及其抗氧化活性研究 [J]. *中成药*, 2022, 44(8): 2435-2443.
- [22] 程斌, 童静玲, 周爱珍, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS 谱-效分析的浙贝母化痰质量标志物的初步筛选及含量差异研究 [J]. *中国药理学杂志*, 2021, 56(6): 462-471.
- [23] 程斌, 周爱珍, 彭昕, 等. 浙贝母 UPLC-Q-TOF-MS/MS 指纹图谱的建立及其抗炎质量标志物的分析 [J]. *中国药房*, 2020, 31(17): 2129-2135.
- [24] 王钰乐, 刘文, 杨道斌, 等. 葛根芩连汤的 UPLC-MS/MS 指纹图谱研究 [J]. *中药新药与临床药理*, 2017, 28(2): 206-211.
- [25] 吴亿晗, 王迪, 杨晓琴, 等. 葛根芩连丸 UPLC 指纹图谱建立及 7 种成分测定 [J]. *中成药*, 2018, 40(5): 1083-1087.
- [26] 李丹, 石沁, 张李, 等. 基于逆流动态提取技术的红丹通络颗粒提取工艺优化研究 [J]. *中药材*, 2022, 45(2): 419-421.
- [27] 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.
- [28] 丰茂秀, 杨颖, 温柔, 等. 经方百合知母汤提取工艺优化 [J]. *中华中医药学刊*, 2021, 39(7): 127-130.

[责任编辑 郑礼胜]