

Box-Behnken 设计-响应面法优化经典名方四妙勇安汤煎煮工艺研究

张 星¹, 赖文静¹, 林 夏¹, 黄 友¹, 杨莎莎¹, 郝怡雯¹, 周靖惟¹, 傅超美¹, 胡昌江¹, 董 艳¹, 耿福能^{1*}, 张 臻^{1,2*}

1. 成都中医药大学药学院, 西南特色中药资源国家重点实验室, 四川 成都 611137

2. 四川新绿色药业科技发展有限公司 中药配方颗粒质量与疗效评价重点实验室, 四川 彭州 610031

摘要: 目的 遵循中医药传承创新发展的基本准则——“遵古原则”, 考察经典名方四妙勇安汤(Simiao Yong'an Decoction, SYD)的煎煮工艺, 确保原汤剂原汁原味的传统功效, 并进行质量综合评价, 为经典名方 SYD 进一步制剂开发提供参考。方法 采用 Box-Behnken 设计-响应面法对加水量、浸泡时间、煎煮时间进行考察, 通过指纹图谱结合多元统计分析进行定性半定量评价, 通过含量测定分析和干膏率进行定量评价, 综合以上评价方法优选煎煮工艺并验证。结果 通过 Box-Behnken 设计-响应面法制备 17 批煎煮样品, 建立了 17 批样品 HPLC 指纹图谱, 标定了 14 个共有峰, 利用多元统计分析对指纹图谱共有峰数据进行主成分分析(principal component analysis, PCA)与正交偏最小二乘法-判别分析(orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA)并计算得分, 结果显示 9 号工艺为最佳煎煮工艺, 即煎煮 2 次, 第 1 次加 16 倍量水, 浸泡 30 min, 煎煮 30 min; 第 2 次加 16 倍量水, 煎煮 30 min。同时采用 HPLC 对 17 批样品进行定量分析, 对绿原酸、阿魏酸等 6 个指标成分进行含量测定, 结合干膏率结果进行综合评分, 结果 9 号煎煮工艺评分最高。对实验结果的 2 种评价方法所得结果一致, 通过工艺验证试验最终确定 SYD 最佳煎煮工艺。结论 利用 Box-Behnken 设计-响应面法, 结合“指纹图谱-多元统计分析-指标成分”多维评价的评控方法, 得出的 SYD 传统最佳煎煮工艺稳定可行, 为煎煮工艺不详的一类经典名方制剂研发提供一种研究模式。

关键词: 四妙勇安汤; 经典名方; 煎煮工艺; 指纹图谱; Box-Behnken 设计-响应面法; 主成分分析; 正交偏最小二乘法-判别分析; 绿原酸; 阿魏酸; 异绿原酸 B; 异绿原酸 A; 异绿原酸 C; 安格洛苷 C; 肉桂酸; 哈巴俄苷; 甘草酸

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)10-3109-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.10.008

Optimization of decocting process of Simiao Yong'an Decoction by Box-Behnken design-response surface methodology

ZHANG Xing¹, LAI Wen-jing¹, LIN Xia¹, HUANG You¹, YANG Sha-sha¹, HAO Yi-wen¹, ZHOU Jing-wei¹, FU Chao-mei¹, HU Chang-jiang¹, DONG Yan¹, GENG Fu-neng¹, ZHANG Zhen^{1,2}

1. State Key Laboratory of Southwestern Chinese Medicine Resources, School of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

2. Key Laboratory of Quality Control and Efficacy Evaluation of Traditional Chinese Medicine Formula Granules, Sichuan New Green Pharmaceutical Technology Development Co., Ltd., Pengzhou 610031, China

Abstract: Objective Following the basic principle of traditional Chinese medicine inheritance, innovation and development – “the principle of following the ancient”, the decocting process of the classic famous recipe Simiao Yong'an Decoction (四妙勇安汤, SYD) was investigated to ensure the original decoction's original traditional efficacy, and the quality was comprehensively evaluated to provide reference for the further preparation development of the classic famous recipe SYD. **Methods** Box-Behnken design-response

收稿日期: 2022-11-07

基金项目: 国家自然科学基金青年基金资助项目(81803742); 四川省科技计划重点研发项目(2020YFS0567); 四川省科技厅应用基础研究项目(2021YJ0251); 四川省中医药管理局中医药科研专项(2021MS109); 四川省教育厅自然科学重点项目(18ZA0187); 成都中医药大学杏林学者青年学者专项(QNXZ2019031); 成都中医药大学杏林学者学科人才科研提升计划项目(XLXZ2022012); 四川新绿色药业博士后科研专项(301022019)

作者简介: 张 星(1998—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药新制剂和新剂型研究。E-mail: 2381225006@qq.com

***通信作者:** 张 臻, 女, 博士, 副教授, 从事中药制剂新技术和新剂型研究。E-mail: zhangzhendr@126.com

耿福能, 男, 博士, 教授, 从事中药新制剂与新剂型研究。E-mail: haoyishenggfn1956@126.com

surface method was used to investigate the amount of water added, soaking time and cooking time. Qualitative and semi-quantitative evaluation was carried out through fingerprint analysis combined with multivariate statistical analysis, and quantitative evaluation was carried out through content determination analysis and dry paste rate, and the above evaluation methods were integrated to optimize the decocting process and verify. **Results** A total of 17 batches of decocting samples were prepared by Box-Behnken design- response surface method, and HPLC fingerprints of 17 batches of samples were established, and 14 common peaks were calibrated. Multivariate statistical analysis was used to perform principal component analysis (PCA) and orthogonal partial least squares- discriminant analysis (OPLS-DA) on the common peak data of fingerprint, and the scores were calculated. The results showed that No. 9 was the best decocting process, that is, decocting for two times, adding 16 times of water to the first time, soaking for 30 min, decocting for 30 min; Add 16 times amount of water for the second time and cook for 30 min. At the same time, 17 batches of samples were quantitatively analyzed by HPLC, and six index components such as chlorogenic acid and ferulic acid were determined. Combined with the results of dry paste rate, the score of No. 9 decocting process was the highest. The results obtained by the two evaluation methods were consistent, and the best decocting technology of SYD was finally determined through the process verification test. **Conclusion** By using Box-Behnken design-response surface method, combined with the multidimensional evaluation and control method of “fingerprint-multivariate statistical analysis-index components”, the optimal traditional decocting process of SYD was stable and feasible, which provided a research model for the development of a class of classic famous recipes with unknown decocting process.

Key words: Simiao Yong'an Decoction; classic famous recipe; decocting process; fingerprint pattern; Box-Behnken design-response surface method; principal component analysis; orthogonal partial least squares-discriminant analysis; chlorogenic acid; ferulic acid; isochlorogenic acid B; isochlorogenic acid A; isochlorogenic acid C; angoroside C; cinnamic acid; harpagoside; glycyrrhizic acid

四妙勇安汤 (Simiao Yong'an Decoction, SYD) 是国家中医药管理局公布的《古代经典名方目录 (第一批)》100 首方剂之一, 出自清代鲍相璈所著《验方新编》, 原书载其方药组成为“金银花、元参各三两, 当归二两, 甘草一两”, 作为清热解毒的代表方剂, 全方配伍共奏“清热解毒、活血止痛”之功, 主治热毒型脱疽, 临床使用具有用量大、效果佳、连续服用的特点^[1]。现代常用于治疗血栓闭塞性脉管炎、糖尿病及其并发症、动脉硬化性闭塞症、冠状动脉粥样硬化心脏病等疾病, 疗效确切、应用广泛^[2-3], 具有良好的临床应用价值与需求。

经典名方制剂开发最关键的难点之一是古籍记载的煎煮工艺不详, 难以保证开发的产品与原汤剂原汁原味的传统功效一致, 故经典名方制剂研发以“遵古”为首要原则, 2021 年 4 月 26 日, 国家药品监督管理局药品审评中心发布了《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 (征求意见稿)》(以下简称“技术指导原则”), 文件中明确指出“应按照国家发布的古代经典名方关键信息及古籍记载, 研究、制备基准样品”, 即遵循“遵古”原则, 保证制剂质量的一致性及临床使用的安全有效。

然而遵照 SYD 古籍记载发现, 原书记载虽指明了处方各药味的用量, 但制备方法的记载仅为“水煎服”, 未明确其煎煮工艺的具体参数, 如加水量、煎煮时间、煎煮次数等。对于煎煮工艺的重要性,

历代医家早有研究, 清代徐灵胎曰: “煎药之法, 最宜深讲, 药之效不效, 全在乎此”^[4-5]。现代研究也表明, 煎药的加水量、浸泡时间、煎煮时间等因素都对中药有效成分的溶出有较大影响, 以煎煮时间为例, 时间过短则有效成分溶出不完全; 时间过长易使结构不稳定成分被破坏^[6]。煎煮工艺作为经典名方制剂开发的关键环节, 煎煮工艺不明则无法确保临床用药的安全性及有效性, 也将阻碍以 SYD 为代表的经典名方的研发上市进程, 因此, 对古籍记载不详的经典名方进行煎煮工艺研究十分必要。

基于此, 本研究遵循“遵古”原则, 采用 Box-Behnken 设计-响应面法 (Box-Behnken design-response surface methodology, BBD-RSM), 整合“指纹图谱-多元统计分析-指标成分”多维评价, 综合指纹图谱-多元统计分析定性半定量、指标成分-干膏率定量分析结果, 对 SYD 煎煮工艺进行试验设计和参数优化, 旨在填补 SYD 制剂研究空白, 为 SYD 后续的制剂开发及工业化生产奠定基础。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Thermo Dionex UltiMate 3000 型高效液相色谱系统, 美国 Thermo Fisher 公司; CPA225D 型电子天平, 十万分之一, 赛多利斯科学仪器 (北京) 有限公司; HR/T20M 型离心机, 湖南赫西仪器装备有限公司; AR224CN 型电子天平, 万分之一, 奥豪斯仪器 (常州) 有限公司; DZF-6050 型真空干燥箱,

上海一恒科学仪器有限公司；HH-2 型恒温水浴锅，常州国华电器有限公司；FTS-10A 型煎药壶，规格 4.5 L，潮州市一壶百饮电器实业有限公司；N-1100 型旋转蒸发仪，上海泉杰仪器有限公司；SHB-III A 型循环水式真空泵，北京中兴伟业有限公司。

1.2 试药

药材金银花（批号 21070114）、玄参（批号 21060112）、当归（批号 21120112）、甘草（批号 21060103）均购自四川国强中药饮片股份有限公司。以上药材均经成都中医药大学中药鉴定专业裴瑾教授鉴定，金银花为忍冬科忍冬属植物忍冬 *Lonicera japonica* Thunb. 的干燥花蕾或带初开的花，玄参为玄参科玄参属植物玄参 *Scrophularia ningpoensis* Hemsl. 的干燥根，当归为伞形科当归属植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels 的干燥根，甘草为豆科甘草属植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根及根茎，均符合《中国药典》2020 年版一部相关项下规定。对照品绿原酸（批号 RFS-L007019080 29）、阿魏酸（批号 RFS-A00211812016）、异绿原酸 A（批号 RFS-Y06802201024）、异绿原酸 B（批号 RFS-Y06911801005）、异绿原酸 C（批号 RFS-Y07011805016）、安格洛昔 C（批号 RFS-A0160210 5014）、哈巴俄昔（批号 RFS-H02001911019）、肉桂酸（批号 RFS-R00311812016）、甘草酸（批号 RFS-G00402007002）购自成都瑞芬思生物科技有限公司，各对照品质量分数均 $\geq 98\%$ ；色谱纯乙腈、甲醇、磷酸，购自美国 Sigma-Aldrich 公司。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 SYD 供试品溶液 参考《中国科学技术史·度量衡卷》^[7]及我国第一部通史性的度量衡史专著《中国度量衡史》^[8]记载的清代度量衡法，可知清代 1 两约合今 37.30 g，并参考国家中医药管理局、国家药品监督管理局目前公布的 7 首和 25 首经典名方关键信息表中剂量内容，发现清代方剂中 1 两折算剂量均为 37.30 g，故确定清代 1 两为今 37.30 g，得出 SYD 原方处方量为金银花、玄参各 111.90 g，当归 74.60 g，甘草 37.30 g。

称取 1/5 处方量（金银花、玄参各 22.38 g，当归 14.92 g，甘草 7.46 g）饮片，各试验号样品按表 1 因素水平进行煎煮，合并煎液，减压浓缩至 200 mL，即为 SYD 样品溶液。取 1 mL SYD 样品溶液，加入 1 mL 甲醇涡旋 3 min，混匀后 12 000 r/min 离

表 1 SYD 煎煮工艺响应面优化试验设计

Table 1 Optimal experimental design of response surface of decoction process of SYD

试验号	因素			试验号	因素		
	X_1 /倍	X_2 /min	X_3 /min		X_1 /倍	X_2 /min	X_3 /min
S1	12	30	60	S10	16	90	30
S2	20	30	60	S11	16	30	90
S3	12	90	60	S12	16	90	90
S4	20	90	60	S13	16	60	60
S5	12	60	30	S14	16	60	60
S6	20	60	30	S15	16	60	60
S7	12	60	90	S16	16	60	60
S8	20	60	90	S17	16	60	60
S9	16	30	30				

心（离心半径 16 cm）10 min，取上清液经 0.22 μ m 微孔滤膜滤过，即得 SYD 供试品溶液。

2.1.2 混合对照品溶液 精密称取绿原酸、阿魏酸、异绿原酸 C、安格洛昔 C、哈巴俄昔、甘草酸对照品适量，加入甲醇制成分别含 0.90、0.19、0.66、0.38、0.33、0.34 mg/mL 的混合对照品溶液。

2.2 BBD-RSM 因素和水平设计

基于前期文献研究^[9-12]及预实验结果，选择对煎煮工艺影响较大的加水量、浸泡时间、煎煮时间及煎煮次数为考察因素，对于 SYD 这类古籍记载内容中仅为“水煎服”等无详细工艺制法表述的经典名方，技术指导原则中明确指出应参照《医疗机构中药煎药室管理规范》并结合具体情况，合理确定制备工艺。

《医疗机构中药煎药室管理规范》文件中对煎煮次数的要求为“每剂药一般煎煮两次，将两煎药汁混合后再分装”，相关文献研究也表明煎药时药材内外溶液的浓度达到平衡时，有效成分不再继续溶出，此时需滤过药液，药渣重新加水煎煮，有效成分才能继续溶出^[13-14]，故依据相关文件文献确定煎煮次数 2 次为宜，在此基础上选取加水量（ X_1 ）、浸泡时间（ X_2 ）、煎煮时间（ X_3 ）为考察因素，因素水平见表 1，按表 1 制备得到得 17 批试验样品。

2.3 指纹图谱评价研究 SYD 煎煮工艺

中药复方以多成分、多靶点协同作用发挥药效，单一或几个成分不能全面反映其整体特征，而中药指纹图谱研究具有整体性的特点，随着现代科学技术的发展，指纹图谱技术趋于成熟，因其宏观分析的优势广泛应用于煎煮工艺评价，可对中药复方所

含复杂成分进行定性半定量分析^[15-17]。

2.3.1 色谱条件 色谱柱为 Thermo Hypersil Gold C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-0.4%磷酸水溶液, 梯度洗脱: 0~3 min, 0~5%乙腈; 3~18 min, 5%~11%乙腈; 18~45 min, 11%~20%乙腈; 45~60 min, 20%~33%乙腈; 60~70 min, 33%~50%乙腈; 70~75 min, 50%~5%乙腈; 体积流量 1 mL/min; 柱温 38 ℃; 进样量 5 μL; 检测波长 273 nm^[18]。

2.3.2 精密度试验 取 1 号试验样品, 按照“2.1.1”项下方法制备供试品溶液, 在“2.3.1”项色谱条件下进行检测, 连续进样 6 次, 计算各共有峰保留时间和峰面积的 RSD 均小于 2%, 表明本方法精密度良好。

2.3.3 稳定性试验 取 1 号试验样品, 按照“2.1.1”项下方法制备供试品溶液, 在“2.3.1”项下色谱条件下, 分别在供试品溶液制备后 0、4、8、12、16、24、48 h 进行检测, 计算各共有峰保留时间和峰面积的 RSD 均小于 2%, 表明供试品溶液在 48 h 内稳定性良好。

2.3.4 重复性试验 取 1 号试验样品, 按照“2.1.1”项下方法平行制备供试品溶液, 共 6 份, 计算各共有峰保留时间和峰面积 RSD 均小于 2%, 表明方法

重复性良好。

2.3.5 指纹图谱分析 将所得 17 批样品色谱图导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012 版)”进行数据分析, 选择特征明显、重复性好、稳定性好的 14 个色谱峰为共有峰, 14 个共有峰中认出 9 个成分, 分别是峰 4 (绿原酸)、6 (阿魏酸)、8 (异绿原酸 B)、9 (异绿原酸 A)、10 (异绿原酸 C)、11 (安格洛苷 C)、12 (肉桂酸)、13 (哈巴俄苷)、14 (甘草酸)。记录各样品色谱图及峰面积数据, 结果见图 1 和表 2。

2.3.6 指纹信息多元统计分析 将 17 批不同煎煮工艺样品共有峰峰面积标准化数据, 导入 SIMCA 14.1 软件进行主成分分析 (principal component analysis, PCA) 和正交偏最小二乘法-判别分析 (orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA) 处理。PCA 结果显示, 17 批不同煎煮工艺样品可分为 2 类, S4、S10~S12、S15 为一类, 其余样品为另一类 (图 2-A)。OPLS-DA 得分矩阵图可知 (图 2-B), 17 批样品数据分成 2 类, 分类结果与 PCA 一致。载荷散点图上点距离原点越远 (图 2-C), 表明对样本的区分能力越强。

为进一步筛选出对上述样本分类贡献较大的成分, 结合变量投影重要性 (variable importance in

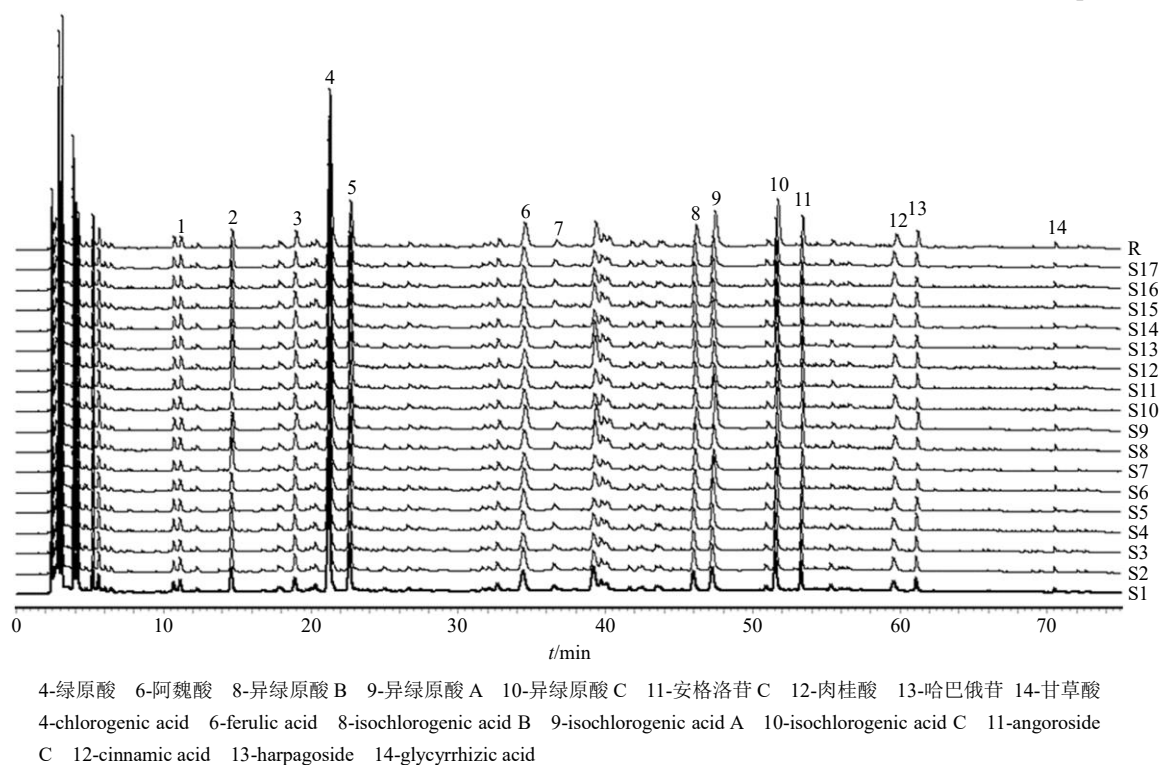


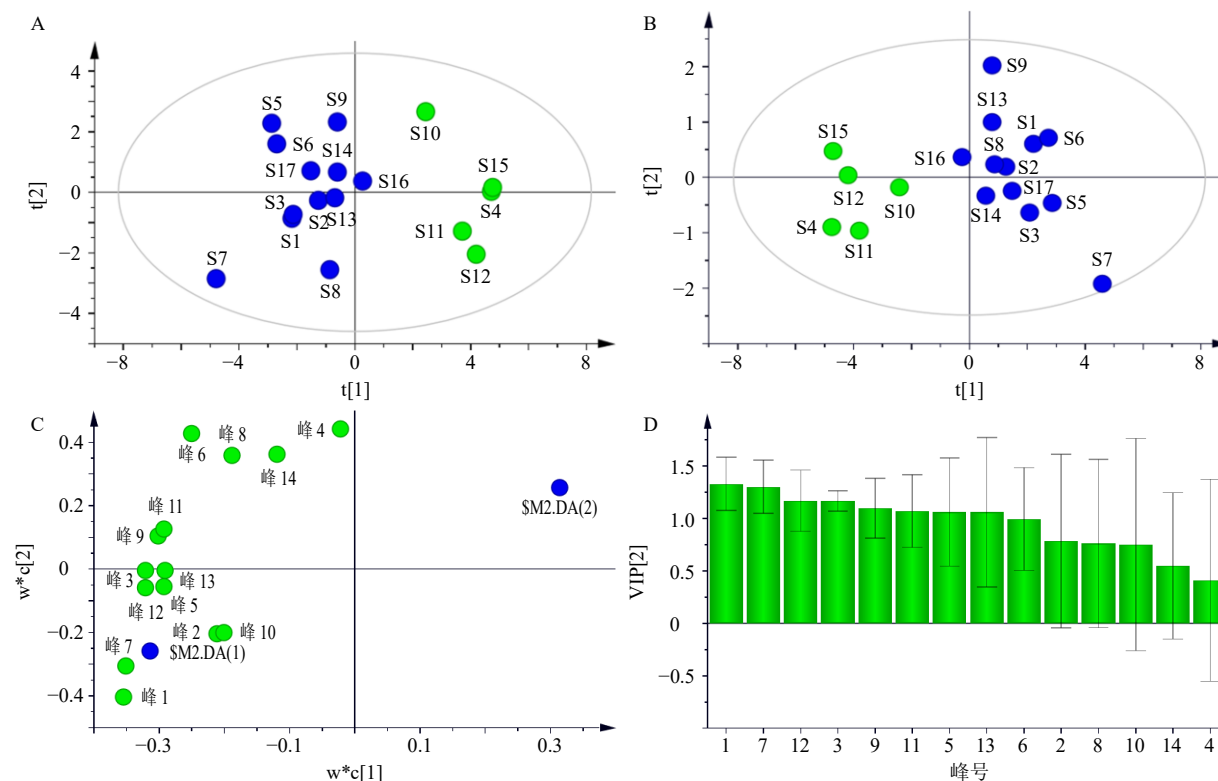
图 1 SYD 不同煎煮条件样品指纹图谱

Fig. 1 Fingerprints of samples of different decoction conditions of SYD

表 2 不同煎煮工艺 SYD 样品色谱峰峰面积

Table 2 Relative peak areas of SYD samples by different decocting methods

试验号	峰面积													
	峰 1	峰 2	峰 3	峰 4	峰 5	峰 6	峰 7	峰 8	峰 9	峰 10	峰 11	峰 12	峰 13	峰 14
S1	9.933	22.931	17.243	131.136	51.790	36.561	8.311	37.099	25.782	32.849	39.037	21.743	11.024	2.714
S2	12.125	20.715	19.205	128.490	53.233	40.363	9.792	29.007	27.170	35.115	40.535	21.817	11.859	2.747
S3	9.933	21.498	17.783	123.725	53.994	31.601	8.564	26.865	24.285	32.218	45.028	25.712	12.863	2.338
S4	16.344	28.807	24.534	138.876	66.662	43.533	19.308	33.143	36.521	46.093	54.828	33.653	20.415	2.663
S5	9.786	17.072	18.986	162.645	49.017	34.255	8.411	16.277	25.400	43.537	44.614	18.506	10.910	1.570
S6	9.926	15.951	16.115	155.646	51.322	35.298	8.020	25.275	25.238	44.570	44.400	18.359	8.760	2.656
S7	7.820	29.827	13.837	107.599	56.668	26.939	8.315	21.278	26.667	26.704	35.306	14.860	5.880	1.815
S8	9.761	30.765	18.865	124.678	63.075	34.102	10.546	42.116	31.403	32.031	41.075	19.443	9.986	2.856
S9	9.725	16.358	19.520	170.137	61.256	42.415	20.267	36.045	36.003	46.524	55.935	21.552	14.051	2.824
S10	15.556	20.520	22.343	166.598	58.854	42.449	16.435	30.132	31.873	57.838	54.728	27.511	12.351	2.526
S11	16.057	35.504	21.963	131.634	66.895	44.937	16.965	35.319	38.114	39.020	53.421	28.939	17.909	2.262
S12	15.593	36.296	24.737	137.369	70.175	39.493	16.110	55.708	37.930	40.721	53.257	28.413	14.718	2.890
S13	10.472	26.797	18.938	151.389	56.865	39.142	9.111	38.667	31.282	38.011	46.459	20.702	9.622	2.441
S14	11.796	24.456	20.290	152.953	58.570	39.552	9.866	23.987	31.382	39.371	47.273	21.860	11.545	1.698
S15	15.036	30.628	23.941	150.938	66.398	46.339	17.644	42.824	38.330	46.818	57.996	31.359	17.740	2.762
S16	10.729	24.474	17.800	151.018	60.993	38.560	13.408	31.359	33.521	42.738	53.825	23.936	9.317	2.452
S17	10.638	24.335	17.690	154.881	54.524	36.531	10.149	22.970	30.627	38.978	47.077	20.750	10.612	1.868



A-PCA 得分图 B-OPLS-DA 得分矩阵 C-OPLS-DA 载荷散点图 D-OPLS-DA 的 VIP 值
A-PCA score B-OPLS-DA score matrix C-OPLS-DA load scatter D-VIP value of OPLS-DA

图 2 17 批不同煎煮工艺 SYD 样品多元统计分析图

Fig. 2 Multivariate statistical analysis of 17 batches of SYD samples with different decocting processes

project, VIP)可更直观地看出各色谱峰的影响程度, VIP 值>1.0 为有意义变量。结果表明,共有 8 个色谱峰的 VIP 值>1 (图 2-D),依次为峰 1、7、12、3、9、11、5、13,说明这 8 种成分可能是将 17 批样品分为 2 类的差异性成分,结果表明不同煎煮工艺样品间成分存在差异。

2.3.7 PCA 计算不同煎煮工艺样品得分 在多元统计分析明确煎煮样品具有差异的基础上,进一步对指纹图谱共有峰数据进行分析计算,以综合评分结果对 17 批煎煮工艺进行评价,将指纹图谱的 14 个共有峰峰面积导入 SPSS 20.0 软件,进行 PCA 处

理。以主成分特征值>1 为提取标准,共提取出 3 个主成分,3 个主成分的累积方差贡献率为 88.909%,故选取前 3 个主成分进行评价(表 3)。

以提取的 3 个主成分的因子得分乘以相应的方差算数平方根得到 3 个主成分的得分,即主成分 1 得分(F_1)=主成分 1 因子得分×初始特征值的算数平方根,以此类推得到主成分 2、3 得分(F_2 、 F_3)。按照公式 $F=0.682\ 921\ F_1+0.216\ 019\ F_2+0.101\ 060\ F_3$ 分别计算 17 个样品的综合得分值,得分结果显示(表 4),9 号煎煮工艺为最佳工艺(即加 16 倍量水,浸泡 30 min,煎煮 30 min,煎煮 2 次)。

表 3 主成分因子的特征值和方差贡献率

Table 3 Eigenvalue and variance contribution rate of principal component factor

主成分	初始特征值			主成分	初始特征值			主成分	初始特征值		
	总计	方差贡献率/%	累积方差贡献率/%		总计	方差贡献率/%	累积方差贡献率/%		总计	方差贡献率/%	累积方差贡献率/%
1*	8.501	60.718	60.718	6	0.198	1.412	97.514	11	0.012	0.088	99.910
2*	2.689	19.207	79.925	7	0.174	1.243	98.757	12	0.007	0.053	99.964
3*	1.258	8.985	88.909	8	0.083	0.592	99.349	13	0.004	0.029	99.993
4	0.681	4.863	93.772	9	0.043	0.307	99.656	14	0.001	0.007	100.000
5	0.326	2.330	96.102	10	0.023	0.166	99.823				

*提取平方和载入的主成分

* select the principal component loaded by the sum of squares

表 4 主成分综合得分排序

Table 4 Ranking of principal component comprehensive score

编号	F_1	F_2	F_3	F	排名	编号	F_1	F_2	F_3	F	排名
S1	-2.179 541	-0.706 493	1.546 214	-1.484 809	14	S10	2.007 581	2.698 667	-0.027 532	1.951 199	5
S2	-1.426 332	-0.159 445	1.084 028	-0.898 963	10	S11	3.298 105	-1.151 659	-1.201 559	1.882 135	6
S3	-2.188 716	-0.607 052	0.088 403	-1.616 920	15	S12	3.570 962	-1.961 822	0.851 960	2.100 994	4
S4	4.088 452	0.066 389	-0.471 671	2.758 764	2	S13	-0.846 206	-0.064 119	0.621 293	-0.528 955	8
S5	-3.016 444	2.341 189	-1.387 850	-1.694 509	16	S14	-0.845 063	0.759 315	-1.526 141	-0.567 317	9
S6	-2.600 644	1.714 705	1.035 629	-1.300 965	13	S15	3.907 701	0.038 722	0.386 063	2.716 031	3
S7	-4.533 149	-2.628 170	-1.311 940	-3.796 101	17	S16	0.219 493	0.492 022	-0.177 988	0.238 195	7
S8	-1.022 483	-2.407 025	1.199 494	-1.097 016	12	S17	-1.559 285	0.830 603	-1.178 487	-1.004 541	11
S9	4.092 220	0.230 776	-0.025 382	2.841 949	1						

2.4 指标成分含量及干膏率评价 SYD 煎煮工艺

采用指纹图谱定性半定量分析对 17 批煎煮样品的指纹数据进行多元统计分析计算,得到最佳煎煮工艺为 9 号。指纹图谱分析具有整体性和模糊性的特点,较全面地反映了复方所含化学成分,但未深入到定量分析层面,目前,关于复方研究也常通过指纹图谱结合定量测定进行研究,故为更加科学合理的评价 SYD 煎煮工艺,在指纹图谱分析的

基础上,进一步采用 HPLC 法对 SYD 中 6 个指标成分进行含量测定,指标成分的选择综合考虑君臣佐使关系、色谱分离度及与药效作用相关等因素,最终确定色谱分离度好且与药效密切相关的绿原酸、阿魏酸、异绿原酸 C、安格洛苷 C、哈巴俄苷、甘草酸 6 个指标成分,结合含量测定和干膏率结果计算煎煮工艺得分,从定量分析角度对工艺进行评价,综合 2 种评分方法所得结果,最终确定最佳煎

煮工艺。

2.4.1 色谱条件 同“2.3.1”项。

2.4.2 系统适应性试验 分别吸取混合对照品溶液、供试品溶液各 5 μL , 注入液相色谱仪, 按“2.4.1”项下色谱条件进样测定, 结果发现各色谱峰分离度、拖尾因子和理论板数均较好, 典型色谱图见图 3。

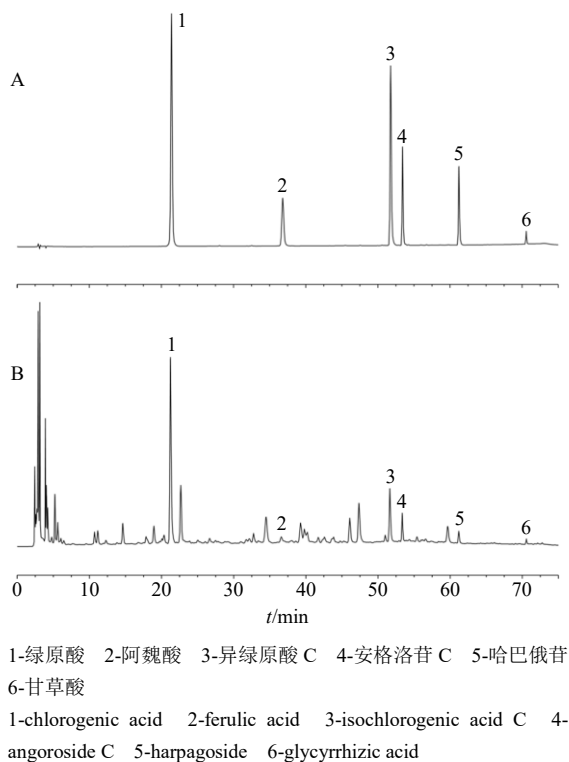


图 3 混合对照品溶液 (A) 和 SYD 供试品溶液 (S1, B) 的 HPLC 图

Fig. 3 HPLC of mixed reference substances (A) and SYD test solution (S1, B)

2.4.3 线性关系考察 分别精密量取“2.1.2”项下制备的对照品溶液各 1 mL, 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液, 分别按照“2.4.1”项下色谱条件进行测定, 以质量浓度为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y) 进行线性回归, 得到回归方程、相关系数 (R^2) 和线性范围分别为绿原酸 $Y=0.183\ 1\ X+0.039\ 9$, $R^2=0.999\ 3$, 线性范围 14.06~900.00 $\mu\text{g/mL}$; 阿魏酸 $Y=0.248\ 6\ X-0.048\ 6$, $R^2=0.999\ 2$, 线性范围 2.92~186.67 $\mu\text{g/mL}$; 异绿原酸 C $Y=0.169\ 8\ X-0.878\ 5$, $R^2=0.999\ 7$, 线性范围 10.36~663.33 $\mu\text{g/mL}$; 安格洛昔 C $Y=0.115\ 5\ X+0.050\ 0$, $R^2=0.999\ 5$, 线性范围 5.94~380.00 $\mu\text{g/mL}$; 哈巴俄昔 $Y=0.119\ 0\ X+0.114\ 7$, $R^2=0.999\ 4$, 线性范围 5.13~328.33 $\mu\text{g/mL}$; 甘草酸 $Y=0.013\ 6\ X-0.137\ 9$, $R^2=$

0.999 7, 线性范围 5.31~340.00 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.4.4 精密度试验 取“2.1.2”项下配制的对照品溶液, 按“2.4.1”项下色谱条件, 连续进样 6 次, 记录绿原酸、阿魏酸、异绿原酸 C、安格洛昔 C、哈巴俄昔、甘草酸色谱峰面积。结果 6 个成分峰面积的 RSD 分别为 1.54%、0.81%、1.11%、1.72%、1.77%、1.13%, 表明仪器精密度符合要求。

2.4.5 重复性试验 取 SYD 样品溶液 (S1), 按“2.1.1”项下方法平行制备 SYD 供试品溶液 6 份, 按“2.4.1”项下色谱条件进样测定, 记录绿原酸、阿魏酸、异绿原酸 C、安格洛昔 C、哈巴俄昔、甘草酸色谱峰面积。结果 6 个成分质量浓度的 RSD 分别为 0.59%、1.39%、0.20%、0.39%、1.45%、1.06%, 结果表明本方法重复性符合要求。

2.4.6 稳定性试验 取 SYD 供试品溶液 (S1), 按“2.4.1”项下色谱条件, 分别于制备后 0、2、4、8、12、24 h 进样, 进样 6 次, 分别记录绿原酸、阿魏酸、异绿原酸 C、安格洛昔 C、哈巴俄昔、甘草酸色谱峰面积。结果 6 个成分峰面积的 RSD 分别为 1.58%、1.71%、1.38%、0.52%、0.68%、0.90%, 表明供试品溶液在 24 h 内基本稳定。

2.4.7 加样回收率试验 精密吸取已知指标成分含量的 SYD 样品溶液 (S1) 1 mL, 分别按样品中各成分含量的 100% 水平每份加入绿原酸、阿魏酸、异绿原酸 C、安格洛昔 C、哈巴俄昔、甘草酸对照品溶液, 按“2.1.1”项下方法平行制备 6 份 SYD 供试品溶液进行含量测定, 计算 6 种指标成分的加样回收率及 RSD 值, 结果 6 种成分各自平均加样回收率分别为 100.29%、101.41%、99.13%、100.12%、99.88%、96.68%, RSD 分别为 0.66%、1.52%、0.23%、0.42%、1.18%、1.62%, 表明该方法加样回收率符合要求。

2.4.8 干膏率的测定 量取 17 批不同煎煮工艺的 SYD 汤液 50 mL, 放于已恒定质量的蒸发皿中, 100 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅上蒸干后, 放入烘箱 105 $^{\circ}\text{C}$ 干燥至恒定质量, 计算煎液干膏率。

干膏率 = 煎液干膏质量 / 饮片投料量

2.4.9 多指标含量测定评价结果 计算各指标性成分含量测定结果, 综合评分设定满分为 100 分, 根据君臣佐使关系划分君药金银花中成分: 绿原酸、异绿原酸 C 权重系数分别为 20, 臣药玄参中成分: 安格洛昔 C、哈巴俄昔权重系数分别为 15, 佐药当归及使药甘草中成分: 阿魏酸、甘草酸权重系数分

别为 10, 干膏率权重系数为 10。在此基础上进行总加权评分^[19-20], 综合评分 = $Y_{\text{绿原酸}}/Y_{\text{绿原酸 max}} \times 20 + Y_{\text{阿魏酸}}/Y_{\text{阿魏酸 max}} \times 10 + Y_{\text{异绿原酸 C}}/Y_{\text{异绿原酸 C max}} \times 20 + Y_{\text{安格洛昔 C}}/Y_{\text{安格洛昔 C max}} \times 15 + Y_{\text{哈巴俄昔}}/Y_{\text{哈巴俄昔 max}} \times 15 + Y_{\text{甘草酸}}/Y_{\text{甘草酸 max}} \times 10 + Y_{\text{干膏}}/Y_{\text{干膏 max}} \times 10$, 综合评分

结果见表 5, 结果显示, 9 号煎煮工艺为最佳工艺, 与指纹图谱综合评分结果相同。

2.5 BBD-RSM 回归模型的建立及方差分析

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

表 5 SYD 煎煮工艺响应面试验设计综合评分结果

Table 5 Comprehensive scoring results of SYD process response surface test design

试验号	质量分数/(mg·g ⁻¹)						干膏率/%	综合评分
	绿原酸	阿魏酸	异绿原酸 C	安格洛昔 C	哈巴俄昔	甘草酸		
S1	12.681	0.902	4.202	3.284	1.639	11.243	42.410	84.770
S2	12.888	1.061	4.359	3.291	1.764	11.374	45.830	88.880
S3	12.282	0.651	4.101	3.301	1.708	9.379	45.120	81.230
S4	11.583	0.795	4.366	3.537	1.960	10.364	46.550	86.760
S5	15.818	0.912	4.789	2.808	1.552	6.732	43.570	84.760
S6	15.591	0.569	4.716	2.633	1.230	10.582	45.980	81.700
S7	10.780	0.828	3.781	2.237	0.786	7.700	42.120	66.210
S8	10.998	1.089	4.406	2.920	1.318	11.805	47.660	82.840
S9	16.468	1.112	4.928	3.236	1.987	11.680	44.650	97.400
S10	14.269	0.711	4.688	2.930	1.179	10.200	45.820	81.780
S11	12.581	0.759	4.494	3.055	1.595	9.351	42.440	81.630
S12	13.163	0.752	4.711	3.200	1.778	11.846	47.180	88.230
S13	14.774	0.988	4.983	3.125	1.428	10.166	45.490	88.650
S14	14.795	1.069	5.068	3.318	1.597	7.239	46.870	89.650
S15	14.471	0.776	4.929	3.386	1.722	11.153	45.970	90.420
S16	14.935	0.784	4.952	2.741	1.050	9.942	45.990	82.320
S17	15.114	1.100	5.048	3.203	1.577	7.907	44.680	89.700

线性回归, 建立各指标综合评分 (Y) 对 3 个因素 (X_1 、 X_2 、 X_3 的 2 次回归模型方程 $Y=88.15+2.90 X_1-1.83 X_2-3.34 X_3+0.35 X_1 X_2+4.92 X_1 X_3+5.56 X_2 X_3-5.56 X_1^2+2.82 X_2^2-3.71 X_3^2$ 。模型的 P 值为 $0.004 6<0.01$, 失拟项 P 值为 $0.793 3>0.05$, 对模型有利, 无失拟因素存在, 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。方差分析结果见表 6, 自变量 1 次项 X_1 、 X_3 , 2 次项 $X_1 X_3$ 、 X_1^2 显著 ($P<0.05$); 自变量 2 次项 $X_2 X_3$ 、 X_1^2 极显著 ($P<0.01$), 表明模型具有统计学意义。各因素对综合评分的影响顺序为 $X_3>X_1>X_2$ 。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 4。

模型拟合结果为加水量 15.931 倍、浸泡时间 30.238 min、煎煮时间为武火沸腾后转文火 36.497 min。依据模型拟合结果和实际操作最终确定 SYD

表 6 方差分析结果

Table 6 ANOVA results

方差来源	平方和	自由度	F 值	P 值	显著性
X_1	67.34	1	8.48	0.022 6	$P<0.05$
X_2	26.94	1	3.39	0.108 0	
X_3	89.31	1	11.25	0.012 2	$P<0.05$
$X_1 X_2$	0.50	1	0.06	0.808 3	
$X_1 X_3$	96.92	1	12.21	0.010 1	$P<0.05$
$X_2 X_3$	123.43	1	15.55	0.005 6	$P<0.01$
X_1^2	130.17	1	16.40	0.004 9	$P<0.01$
X_2^2	33.54	1	4.22	0.078 9	
X_3^2	57.96	1	7.30	0.030 5	$P<0.05$
残差	55.57	7			
失拟项	11.52	3	0.35	0.793 3	
纯误差	44.04	4			
总合	680.39	16			

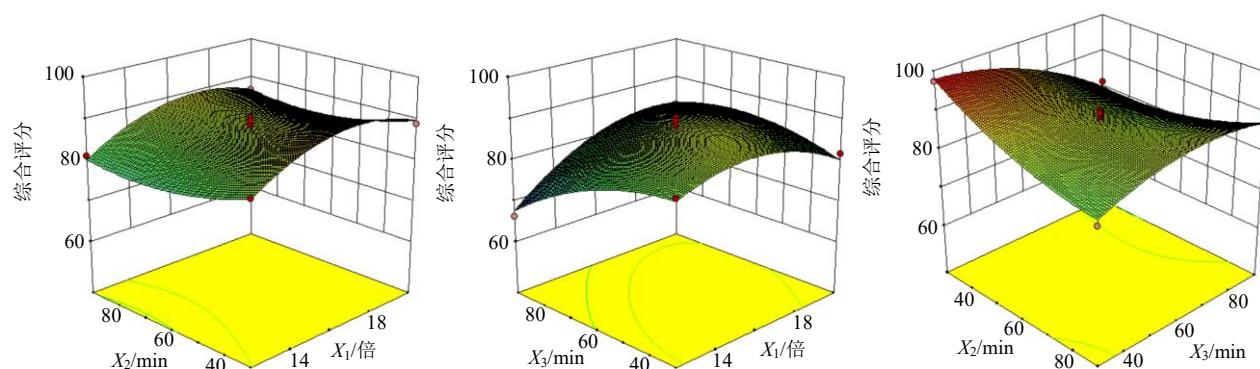


图 4 3 因素对综合评分的响应面图

Fig. 4 Response surface plot of 3-factor to composite score

煎煮工艺为加 16 倍量水, 浸泡 30 min, 煎煮 30 min, 煎煮 2 次。采用 HPLC 对指标成分进行含量测定, 综合干膏率结果表明 9 号煎煮工艺最优, 与指纹图谱分析结果一致, 2 种评价方法从定性与定量的角度, 科学合理地说明了加 16 倍量水, 浸泡 30 min, 煎煮 30 min, 煎煮 2 次的煎煮工艺合理最优。

2.6 工艺验证试验

选择最佳煎煮工艺条件进行 3 批验证试验, 按上述方法进行含量测定, 计算得到 3 批验证样品含量测定的综合得分分别为 97.560、97.730、97.390, 预测值为 97.43 (表 7), 基本吻合, 说明优化得到的煎煮工艺条件较为稳定, 具备可行性, 即 SYD 最

表 7 验证实验结果

Table 7 Verification test results

试验号	质量分数/(mg·g ⁻¹)						干膏率/%	综合评分
	绿原酸	阿魏酸	异绿原酸 C	安格洛昔 C	哈巴俄苷	甘草酸		
1	16.283	1.048	4.907	3.219	1.973	10.685	44.655	97.560
2	16.332	1.138	5.027	2.999	2.024	10.717	42.032	97.730
3	16.114	1.019	4.836	3.314	1.952	10.713	45.923	97.390

佳煎煮工艺为煎煮 2 次, 第 1 次加 16 倍量水, 浸泡 30 min, 煎煮 30 min; 第 2 次加 16 倍量水, 煎煮 30 min。

3 讨论

本研究基于“遵古”理念, 以现行标准规范为参照, 衔接古籍记载和现行规范, 建立了以“指纹图谱-多元统计分析”和“指标成分含量-出膏率”为评价方式的煎煮工艺研究模式, 确定以加水量、浸泡时间、煎煮时间作为关键工艺参数, 采用 Box-Behnken 设计优化经典名方 SYD 煎煮工艺。所建立的综合评价研究模式, 结合了指纹图谱-多元统计定性半定量分析、指标成分-干膏率定量分析 2 种评价方式优选最佳工艺, 既包含了指纹图谱分析整体全面的优点, 又结合了指标成分定量测定弥补指纹图谱分析的不足, 2 种评价方式相辅相成, 共同解决了 SYD 古籍记载煎煮工艺不详的关键问题, 为这一类经典名方制剂的研发提供了一种科学合理的研究模式, 具有一定参考应用价值。

中药复方具有多成分、多靶点、多层次的特点, 单一指标不能全面整体地反映复方特征, 多指标综合评价可综合多项重要指标, 较单一指标评价更具优势, 可对煎煮工艺进行更加科学合理地评价, 进而优选得到最佳工艺, 保障制剂质量及临床用药的安全有效^[21-22]。故本研究首先利用指纹图谱整体描述不同煎煮工艺样品成分情况, 指纹图谱包含化学信息量大, 可较充分地反映出中药复杂混合体系中主要功效成分整体状况^[23-24], 再利用 PCA、OPLS-DA 多元统计分析样品指纹图谱数据, 建立相关模型计算得分, 确定最佳煎煮工艺; 为弥补指纹图谱分析模糊及半定量的不足, 进一步选取功效相关的 6 个重要指标成分进行含量测定及出膏率研究, 再次对工艺进行评价, 综合 2 次评价结果最终确定 SYD 最佳煎煮工艺为加水量 16 倍, 浸泡 30 min, 煎煮 30 min, 同时通过验证试验说明该工艺条件较为稳定可行。

SYD 功效的指标成分的选择是本研究的主要

环节, 基于《中国药典》2020 年版含测指标成分及文献报道有效成分, 结合预实验结果综合考虑, 从方剂君臣佐使关系入手选取绿原酸、阿魏酸、异绿原酸 C、安格洛昔 C、哈巴俄昔、甘草酸 6 个成分作为含测指标成分, 其中绿原酸、异绿原酸 C、阿魏酸、哈巴俄昔、甘草酸均为《中国药典》2020 年版中金银花、玄参、当归、甘草规定含测指标成分。绿原酸作为君药金银花中主要有效成分, 现代研究发现其具有抗氧化、抗肿瘤、抗菌、抗病毒、免疫调节等多种药理作用^[25]。

异绿原酸 C 为君药金银花所含酚酸类成分之一, 具有良好的抗炎作用^[26], 可抑制多种炎症因子释放, 是 SYD 治疗心血管系统疾病的重要有效成分。阿魏酸具有抗氧化和抗炎效果^[27], 且抗血栓效果突出, 能明显抑制血小板聚集, 控制血栓素的释放^[28]。安格洛昔 C 是玄参中苯丙素苷类代表性成分, 在玄参药材中含量较高, 可作为其质量控制指标之一^[29], 安格洛昔 C 还具有抗血小板聚集作用, 是 SYD 治疗动脉粥样硬化的物质基础, 与玄参的抗炎活性也密切相关^[30-31]。玄参中环烯醚萜类成分哈巴俄昔能够减轻细胞膜损伤, 保护血管内皮细胞, 预防动脉粥样硬化的产生; 还能发挥保肝及增强免疫的作用^[32-33]。甘草酸是甘草中最重要的有效成分之一, 具有抗病毒、抗炎杀菌、抗肿瘤及抗心肌缺血的作用^[34]。

综上, 本研究结果补充了 SYD 古籍记载煎煮工艺的空白, 为 SYD 的后续复方制剂研究奠定基础, 也可为其他古籍煎煮工艺记载不详的经典名方研究提供一定参考与借鉴。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 赵红霞, 于智敏, 耿颖, 等. 四妙勇安汤方源探析 [J]. 中国中药杂志, 2020, 45(5): 1209-1212.
- [2] 郑亮, 王梦月, 陈钟, 等. 四妙勇安汤研究进展 [J]. 中成药, 2019, 41(6): 1365-1370.
- [3] 张可兴, 刘树民. 四妙勇安汤现代研究进展 [J]. 中国药物依赖性杂志, 2019, 28(6): 415-419.
- [4] 李娟, 张悦健, 李腾腾, 等. 四妙勇安汤“异病同治”脱疽、糖尿病和冠心病的网络药理学作用机制研究 [J]. 药物评价研究, 2021, 44(5): 936-948.
- [5] 田军军, 刘莹, 冯广义. 中药汤剂煎煮法和有效成分溶出率关系探讨 [J]. 吉林中医药, 2008, 28(5): 373-374.
- [6] 卢芳国, 张世鹰, 吴治彦, 等. 中药煎煮的容器、溶媒、时间、火候因素 [J]. 中医杂志, 2016, 57(1): 78-80.
- [7] 卢嘉锡总主编. 丘光明等著. 中国科学技术史 (度量衡卷) [M]. 北京: 科学出版社, 2001: 117.
- [8] 王丹. 评吴承洛: 《中国度量衡史》 [J]. 青春岁月, 2015(21): 399.
- [9] 赵玥瑛, 王昌海, 张泽康, 等. Box-Behnken 设计-响应面法结合基准关联度和 AHP-熵权法优化经典名方小承气汤的提取工艺 [J]. 中草药, 2022, 53(20): 6472-6480.
- [10] 徐蓓蕾, 韩晓宇, 刘晶晶, 等. 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 [J]. 中草药, 2022, 53(22): 7070-7081.
- [11] 樊箫雨, 杨凯丽, 李花花, 等. 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 [J]. 中草药, 2022, 53(21): 6716-6725.
- [12] 庄延双, 蔡皓, 刘晓, 等. 影响中药煎剂质量的因素分析 [J]. 中国药房, 2012, 23(11): 1048-1050.
- [13] 杨蓉, 郑虎占. 中药煎煮法的现代研究概况 [J]. 中国医药科学, 2012, 2(17): 44-46.
- [14] 张立双, 江丰, 赵晨, 等. 中药汤剂煎煮法的文献调查分析 [J]. 天津中医药, 2017, 34(6): 422-428.
- [15] 程翼宇, 陈闽军, 吴永江. 化学指纹图谱的相似性测度及其评价方法 [J]. 化学学报, 2002, 60(11): 2017-2021.
- [16] 周建良, 齐炼文, 李萍. 色谱指纹图谱在中药质量控制中的应用 [J]. 色谱, 2008, 26(2): 153-159.
- [17] 谢培山. 色谱指纹图谱分析是中草药质量控制的可行策略 [J]. 中药新药与临床药理, 2001, 12(3): 141-151.
- [18] Zheng L, Wang M Y, Chen Z, et al. Simultaneous quantitation of 13 active components in Simiao Yong'an Decoction using high-performance liquid chromatography with diode array detection [J]. Acta Chromatogr, 2019, 31(3): 216-221.
- [19] 陈林伟, 秦昆明, 王琴, 等. Box-Behnken 响应面法优选气血双补酒的渗漉提取工艺 [J]. 中草药, 2015, 46(8): 1151-1155.
- [20] 刘思鸿, 赵汉青, 高宏杰, 等. 一种基于中医“君臣佐使”理论的加权网络模块划分优化方法 [J]. 中国中药杂志, 2021, 46(22): 5936-5943.
- [21] 张星, 张臻, 林夏, 等. 经典名方制剂开发的主要环节关键技术问题探析 [J]. 中草药, 2021, 52(21): 6724-6731.
- [22] 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.
- [23] 刘东方, 赵丽娜, 李银峰, 等. 中药指纹图谱技术的研究进展及应用 [J]. 中草药, 2016, 47(22): 4085-4094.
- [24] 李强, 杜思邈, 张忠亮, 等. 中药指纹图谱技术进展及未来发展方向展望 [J]. 中草药, 2013, 44(22): 3095-3104.

- [25] 吴卫华, 康桢, 欧阳冬生, 等. 绿原酸的药理学研究进展 [J]. 天然产物研究与开发, 2006, 18(4): 691-694.
- [26] Su X R, Zhu Z H, Zhang L, *et al.* Anti-inflammatory property and functional substances of *Lonicerae Japonicae Caulis* [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 267: 113502.
- [27] 张欣, 高增平. 阿魏酸的研究进展 [J]. 中国现代中药, 2020, 22(1): 138-147.
- [28] 王凤龙, 刘员, 张来宾, 等. 当归抗炎镇痛作用研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(15): 197-209.
- [29] 闫丹, 江敏瑜, 王云红, 等. 一测多评法在玄参药材质量控制中的应用 [J]. 中草药, 2018, 49(20): 4892-4898.
- [30] 李翎熙, 陈迪路, 周小江. 玄参化学成分、药理活性研究进展及其质量标志物分析预测 [J]. 中成药, 2020, 42(9): 2417-2426.
- [31] 卢芳, 于卉, 张宁, 等. 玄参保护心血管系统的药理作用研究进展 [J]. 中国药房, 2016, 27(22): 3148-3150.
- [32] 崔忠生, 邸科前, 马焕云. 哈巴苷及哈巴俄苷对过氧化氢损伤血管内皮细胞的保护作用 [J]. 医学研究与教育, 2009, 26(2): 11-12.
- [33] 师怡, 许晖, 阙慧卿, 等. 玄参化学成分的药理作用和分析方法 [J]. 海峡药学, 2006, 18(4): 58-61.
- [34] 李雨婧, 杜江源, 李嘉诚, 等. 甘草酸及其衍生物对脓毒症诱导器官损伤的保护作用研究进展 [J]. 中药药理与临床, 2022, 38(3): 221-224.

[责任编辑 郑礼胜]