

Box-Behnken 响应面结合 FAHP-熵权法和基准关联度优化经典名方泻白散的提取工艺

王 锐, 邱智东, 刘 滢, 董金香, 贾艾玲, 刁元元, 李军鸽*

长春中医药大学, 吉林 长春 130117

摘要: 目的 评价古方工艺与现代工艺样品质量的一致性, 优化泻白散的提取工艺。方法 选取加水量、提取时间和提取次数为关键影响因素, 采用单因素结合 Box-Behnken 响应面设计, 以桑皮苷 A、指纹图谱相似度、出膏率以及地骨皮乙素为评价指标, 通过模糊层次分析法 (fuzzy analytical hierarchy process, FAHP)-熵权法结合基准关联度确定各指标权重系数, 计算综合评分, 优选出与泻白散基准样品最为接近的现代提取工艺。结果 建立的工艺评价函数模型: 综合评分 = SR_{ij} 桑皮苷 A $\times 0.22 + SR_{ij}$ 指纹图谱相似度 $\times 0.21 + SR_{ij}$ 出膏率 $\times 0.34 + SR_{ij}$ 地骨皮乙素 $\times 0.23$, 模型预测最佳提取工艺为加 10 倍水量, 煎煮 2 次, 每次 90 min。验证试验综合评分均值为 98.44, RSD 为 0.37%, 符合基准样品标准的质量要求。结论 该提取方法稳定可行, 能够为其他经典名方开发提供理论依据。

关键词: 基准关联度; 提取工艺; 泻白散; Box-Behnken 响应面法; 模糊层次分析法-熵权法; 桑皮苷 A; 地骨皮乙素

中图分类号: R283.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2023)18-5923-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.18.010

Optimization of extraction process for classical prescription Xiebai San based on Box-Behnken response surface combined with fuzzy analytic hierarchy process-entropy method and benchmark correlation degree

WANG Rui, QIU Zhi-dong, LIU Ying, DONG Jin-xiang, JIA Ai-ling, DIAO Yuan-yuan, LI Jun-ge

Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China

Abstract: Objective To evaluate the consistency of the quality of ancient and modern process samples and optimize the extraction process of Xiebai San (泻白散). **Methods** The amount of water added, extraction time and extraction times were selected as the key influencing factors, and the single factor combined with Box-Behnken response surface design, mulberroside A, fingerprint similarity, paste yield and kukoamine B were used as evaluation indexes. The weight coefficient of each index was determined by fuzzy analytic hierarchy process (FAHP)-entropy weight method combined with benchmark correlation degree, and the comprehensive score was calculated to optimize the modern extraction process closest to the benchmark sample of Xiebai San. **Results** Establishment of process evaluation function mode: Comprehensive score = SR_{ij} mulberroside A $\times 0.22 + SR_{ij}$ fingerprint similarity $\times 0.21 + SR_{ij}$ extract rate $\times 0.34 + SR_{ij}$ kukoamine B $\times 0.23$. The model predicted that the best extraction process was to add 10 times amount of water, decocted twice, 90 min each time. The average comprehensive score of validation test was 98.44, RSD was 0.37%, which met the quality requirements of the reference sample standard. **Conclusion** The extraction method was stable and feasible, which can provide a theoretical basis for the the development of other classic prescription.

Key words: benchmark correlation degree; extraction process; Xiebai San; Box-Behnken response surface methodology; fuzzy analytic hierarchy process-entropy weight method; mulberroside A; kukoamine B

泻白散出自宋代钱乙的《小儿药证直诀》^[1], 入选国家中医药管理局发布的《古代经典名方目录(第一批)》^[2], 原方记载: “地骨皮、桑白皮(炒各一

两), 甘草(炙一钱), 上锉散, 入粳米一撮, 水二小盏, 煎七分, 食前服”^[3]。方中桑白皮主入肺经, 能平抑喘逆, 清泻肺热^[4], 为君药。地骨皮性寒入

收稿日期: 2023-03-30

基金项目: 吉林省科技计划重点研发项目(2020040491YY)

作者简介: 王 锐(1999—), 女, 硕士研究生, 主要从事中药基础研究与新药开发。Tel: 18744108018 E-mail: qwe992671841@qq.com

*通信作者: 李军鸽(1990—), 女, 实验师, 主要从事中药制剂研究。Tel: (0431)86763972 E-mail: 407332695@qq.com

肺,能凉血除蒸,清降肺腑火,为臣药。甘草和粳米为佐使药,甘草止咳平喘,调和诸药,粳米健脾益胃,二者合用有培土生津之意。诸药合用,具有清热、止咳等功效,主治肺热喘咳、气喘咳嗽、降气化痰等^[5]。

按照国家药品监督管理局发布的《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)》^[6]的要求,经典名方的开发需按照国家发布的关键信息进行研究,得到的制剂产品质量需与基准样品质量保持一致,基准样品的质量应由出膏率、多指标成分、指纹图谱等关键质量属性进行表征,考虑现代方法难以与古法完全吻合,因此在制剂生产的第一环节提取工艺上要保证与基准样品质量保持最大限度的一致,即采用与基准样品关键质量属性参数最相近的作为最优提取工艺。本实验在课题组的前期研究基础上^[7-8],从质量源于设计(quality by design, QbD)和秉承“守正创新”的理念出发,加强对制剂过程的控制,从提取工艺设计到生产过程中保证制剂质量。采用单因素实验结合 Box-Behnken 设计-响应面法(Box-Behnken design-response surface method, BBD-RSM)对现代提取工艺进行设计,并运用区别于传统层次分次法的模糊层次分析法(fuzzy analytic hierarchy process, FAHP)及熵权法对指标进行分析,主客观赋权法相结合^[9],从中医药角度出发将处方中的君臣佐使药味与各项指标对制剂质量影响的重要性进行结合,旨在追求试验的科学性和合理性,研究引入基准关联度(standard relation, SR)分析^[10],基准关联度值越接近1,证明关联程度越大,古代与现代工艺越相似。为后续如何保证成型工艺与基准样品的质量一致性提供了科学的评价依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

安捷伦 1260 高效液相色谱仪,美国安捷伦公司;JM-A5002 型电子天平,诸暨市超泽衡器设备有限公司;FT-30H 型电子煎药壶,深圳市正云科技有限公司;DTL-22R 型电陶炉,合肥荣事达小家电有限公司;RE-52AA 型旋转蒸发器,上海亚荣生化仪器厂;FDU-1200 型冷冻干燥机,上海政泓实业有限公司;KQ-500B 型超声波清洗器,昆山市超声仪器;MS105 型十万分之一电子天平、EL204 型万分之一电子天平,梅特勒-托利多仪器有限公司;DZF-6210 真空干燥箱,上海一恒科学仪器有限公司;BD-

308NUD 海信(山东)冰箱,海信家电集团股份有限公司。

1.2 试剂与药物

对照品地骨皮乙素(批号 P23F12F139847,质量分数 98%)购自上海源叶生物科技有限公司;对照品桑皮苷 A(批号 112086-202101,质量分数 93.2%)、甘草苷(批号 111610-201908,质量分数 95.0%)、甘草酸铵(批号 110731-201619,质量分数 93.0%)均购自中国食品药品检定研究院;甲醇、磷酸、三氟乙酸均为色谱纯,购自赛默飞世尔中国公司;甲醇、冰醋酸均为分析级,购自北京化工厂;水为纯净水。

炒桑白皮、地骨皮、炒甘草、粳米,批号及产地见表 1,以上药材均购自吉林国安药业有限公司,并经长春中医药大学中药鉴定教研室翁丽丽教授鉴定,桑白皮为桑科桑属植物桑 *Morus alba* L. 的干燥根皮,地骨皮为茄科枸杞属植物宁夏枸杞 *Lycium barbarum* L. 的干燥根皮,甘草为豆科甘草属植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根和根茎。以上药材均按照《中国药典》2020 年版方法炮制成药符合要求的饮片。

2 方法与结果

2.1 泻白散基准样品的制备

将组方饮片按照表 2 顺序组合,取炒桑白皮 8.86 g,地骨皮 8.86 g,炒甘草 0.89 g,粉碎成粗粒(过四目筛),另加粳米 6.00 g,加水 900 mL,武火加热至沸腾后,文火煎煮至 540 mL,用 100 目滤布进行滤过,在 70 °C 下减压浓缩后于 -40 °C 预冷冻 48 h,迅速转移至 -80 °C 的真空冷冻干燥机,干燥 74 h 后取出,即得。

2.2 出膏率的测定

量取泻白散提取液 100 mL,置于洁净恒定质量的蒸发皿中,水浴浓缩至稠膏,于 60 °C 真空干燥箱中直至达到恒定质量,称量干膏质量。已知 540 mL 提取液中干膏质量(m),投料饮片质量(M),总提取液体积(V),则全方出膏率= $mV/100M$ 。

2.3 指纹图谱的建立

2.3.1 色谱条件 色谱柱为 Agilent Zorbax SB-Aq (250 mm×4.6 mm, 5 μm);以乙腈-0.1%磷酸水溶液为流动相,梯度洗脱:0~9 min, 5%~10%乙腈;9~26 min, 10%~12%乙腈;26~46 min, 12%~25%乙腈;46~86 min, 25%~58%乙腈;86~90 min, 58%~70%乙腈;90~100 min, 70%~5%乙腈;体

表1 方中各药材、饮片批号与产地

Table 1 Batch numbers and origins of each medicinal material and decoction piece in prescriptions

药材名称	药材批号	饮片批号	产地
桑白皮	HWW-20200821-01~05	1-HWW-20200821-01~05	河南省温县武德镇
桑白皮	ABL-20201115-01~05	1-ABL-20201115-01~05	安徽省亳州市利辛县
桑白皮	ABQ-20201026-01~05	1-ABQ-20201026-01~05	安徽省亳州市谯城区
地骨皮	NZN-20180926-01~05	1-NZN-20180926-01~05	宁夏中宁县宁安镇
地骨皮	NSY-20181015-01~05	1-NSY-20181015-01~05	宁夏石嘴山市惠农区
地骨皮	NYD-20181015-01~05	1-NYD-20181015-01~05	宁夏银川市兴庆区大新镇
甘草	NBW-20180718-01~05	1-NBW-20180718-01~05	内蒙古巴彦卓尔市乌拉特前旗明安镇
甘草	NCN-20180728-04~05	1-NCN-20180728-04~05	内蒙古赤峰市松山区当铺地满族乡
甘草	NCS-20180728-01~03	1-NCS-20180728-01~03	内蒙古赤峰市松山区穆家营子镇
甘草	GLY-20181220-01~05	1-GLY-20181220-01~05	甘肃省兰州市榆中县哈岷乡
粳米	HBA-20210818-01~05	1-HBA-20210818-01~05	河北省保定市安国市大五女镇
粳米	TNM-20210705-01~05	1-TNM-20210705-01~05	天津市宁河区苗庄镇
粳米	JJP-20210623-01~05	1-JJP-20210623-01~05	吉林省吉林市磐石市

表2 15批药材与泻白散基准样品的对应关系

Table 2 Corresponding relationship between 15 batches of medicinal materials and Xiebai San reference samples

基准样品编号	桑白皮药材批号	地骨皮药材批号	甘草药材批号	粳米药材批号
S1	HWW-20200821-04	NYD-20181015-03	NBW-20180718-02	TNM-20210705-02
S2	ABL-20201115-02	NSY-20181015-05	GLY-20181220-03	TNM-20210705-04
S3	HWW-20200821-05	NSY-20181015-02	NBW-20180718-03	HBA-20210818-05
S4	ABL-20201115-05	NSY-20181015-04	NBW-20180718-01	JJP-20210623-02
S5	ABQ-20201026-02	NYD-20181015-04	GLY-20181220-01	JJP-20210623-05
S6	HWW-20200821-03	NZN-20180926-03	GLY-20181220-05	TNM-20210705-03
S7	ABL-20201115-03	NYD-20181015-02	GLY-20181220-02	JJP-20210623-04
S8	HWW-20200821-02	NZN-20180926-05	GLY-20181220-04	HBA-20210818-01
S9	ABL-20201115-01	NSY-20181015-03	NCS-20180728-01	HBA-20210818-04
S10	ABQ-20201026-03	NZN-20180926-02	NBW-20180718-05	HBA-20210818-02
S11	HWW-20200821-01	NZN-20180926-04	NBW-20180718-04	HBA-20210818-03
S12	ABQ-20201026-04	NYD-20181015-05	NCS-20180728-03	JJP-20210623-03
S13	ABQ-20201026-01	NYD-20181015-01	NCS-20180728-02	TNM-20210705-05
S14	ABQ-20201026-05	NZN-20180926-01	NCN-20180728-04	JJP-20210623-01
S15	ABL-20201115-04	NSY-20181015-01	NCN-20180728-05	TNM-20210705-01

积流量 1 mL/min; 柱温 30 ℃; 检测波长 278 nm; 进样量 10 μL。

2.3.2 供试品溶液的制备 取冻干粉约 0.5 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 50% 甲醇 25 mL, 称定质量, 超声处理 (功率 250 W、频率 50 kHz) 30 min, 放冷, 再称定质量, 用 50% 甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得供试品溶液。

2.3.3 稳定性考察 取编号 S1 基准样品, 按“2.3.2”项下方法制备供试品溶液, 精密吸取供试品溶液 10

μL, 分别在制备后 0、2、4、8、12、24、48 h 注入色谱仪进行测定。以桑皮苷 A 为参照 (S), 计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果 23 个共有峰相对保留时间的 RSD 为 0.32%~0.64%, 相对峰面积的 RSD 为 1.02%~1.93%, 结果表明该方法稳定性良好。

2.3.4 精密度考察 精密吸取 S1 供试品溶液 10 μL, 注入液相色谱仪, 连续进样 6 次, 依法测定, 记录峰面积, 结果指纹图谱中共有峰相对保留时间

的 RSD 为 0.06%~0.12%，相对峰面积的 RSD 为 0.18%~1.97%，结果表明仪器精密度良好。

2.3.5 重复性试验 精密称取 S1 样品共 6 份，分别按“2.3.2”项下方法制备供试品溶液，依法独立测定，结果指纹图谱中各共有峰相对保留时间的 RSD 均小于 1%，相对峰面积的 RSD 均小于 5%，表明该方法重复性良好。

2.3.6 相似度评价及共有峰确认 采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统（2012 版）”软件，进行相似度评价，15 批泻白散基准样品（S1~S15），共标定了 23 个共有峰（图 1），将泻白散基准样品、各饮片单煎及饮片的阴性指纹图谱（图 2）对比分析，对 23 个共有峰进行峰归属，结果如图 1、2 所示。其中，峰 1、2、3、6、7、9（桑皮苷 A）、10、

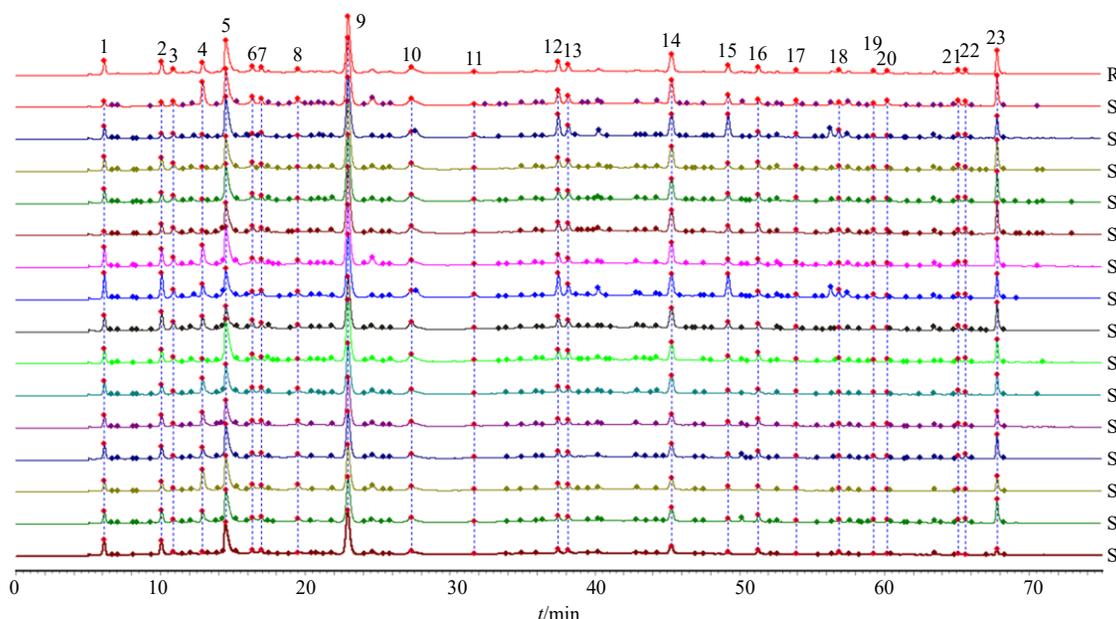


图 1 15 批泻白散基准样品的指纹图谱 (S1~S15) 及其对照指纹图谱 (R)

Fig. 1 Fingerprints (S1—S15) of 15 batches of Xiebai San benchmark samples and their control fingerprints (R)

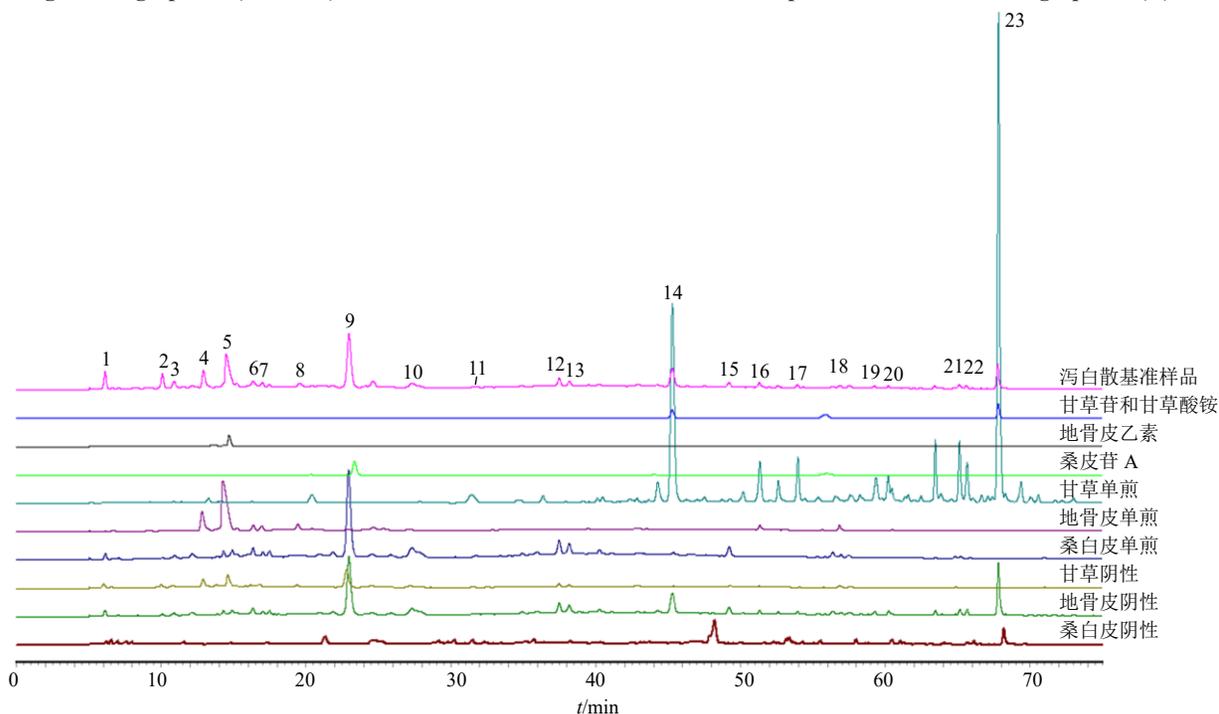


图 2 各味药材饮片及阴性样品与基准样品对照图谱比较

Fig. 2 Comparison of medicinal drinking slices and negative and benchmark samples

12、13、15、18 归属于桑白皮；峰 4、5（地骨皮乙素）、8 归属于地骨皮；峰 11、14（甘草苷）、16、17、19、20、22、23（甘草酸铵）归属于甘草。以 9 号峰（桑皮苷 A）为参照峰，各共有峰相对保留时间的 RSD 均小于 1%、相对峰面积的 RSD 均小于 5%，表明不同批次间泻白散基准样品的化学成分基本一致，建立的指纹图谱方法准确可靠。

2.4 桑皮苷 A 和地骨皮乙素的含量测定

2.4.1 桑皮苷 A

(1) 色谱条件：色谱柱为 Agilent Zorbax SB-Aq (250 mm×4.6 mm, 5 μm)；以甲醇-0.1%磷酸水溶液为流动相，梯度洗脱：0~25 min, 15%~70% 甲醇；25~35 min, 70% 甲醇；35~45 min, 70%~15% 甲醇；45~60 min, 15% 甲醇；体积流量 1 mL/min；检测波长 325 nm；柱温 30 ℃；进样量 10 μL。

(2) 对照品溶液的制备：精密称取桑皮苷 A 对照品 10.81 mg，加 70% 甲醇制成 0.116 0 mg/mL 的桑皮苷 A 对照品溶液。

(3) 供试品溶液的制备：取冻干粉约 0.2 g，精密称定，置锥形瓶中，精密加入 70% 甲醇 50 mL，称定质量，超声处理（功率 250 W、频率 50 kHz）20 min，放冷，用 70% 甲醇补足减失的质量，摇匀，滤过，取续滤液，即得供试品溶液。

2.4.2 地骨皮乙素

(1) 色谱条件：色谱柱为 Agilent Zorbax SB-Aq (250 mm×4.6 mm, 5 μm)；以甲醇-0.2%三氟乙酸水溶液 (pH 1.65) 为流动相，梯度洗脱：0~10 min, 12% 甲醇；10~20 min, 12%~16% 甲醇；20~40 min, 16% 甲醇；40~60 min, 16%~22% 甲醇；检测波长 280 nm；体积流量 1 mL/min；柱温 30 ℃；进样量 10 μL。

(2) 对照品溶液的制备：精密称取地骨皮乙素对照品 10.12 mg，加 0.5% 醋酸的 50% 甲醇溶液配制成 0.103 3 mg/mL 的地骨皮乙素对照品溶液。

(3) 供试品溶液的制备：取冻干粉约 0.2 g，精密称定，置锥形瓶中，精密加入含 0.5% 醋酸的 50% 甲醇溶液 25 mL，称定质量，超声处理（功率 250 W、频率 50 kHz）30 min，放冷，再称定质量，用 0.5% 醋酸的 50% 甲醇溶液补足减失的质量，摇匀，滤过，取续滤液，即得供试品溶液。

2.4.3 专属性考察 按“2.4.1”“2.4.2”项下方法制备桑皮苷 A 和地骨皮乙素供试品溶液和对照品溶液，分别按“2.4.1”“2.4.2”项下色谱条件测定，结

果分离度良好，阴性无干扰。含量测定的图谱见图 3、4。

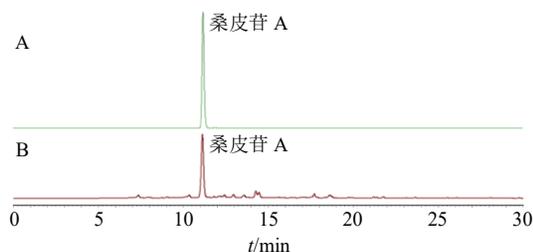


图 3 桑皮苷 A 对照品 (A) 和泻白散基准样品 (B) 的 HPLC 图

Fig. 3 HPLC of mulberroside A reference substance (A) and Xiebai San benchmark sample (B)

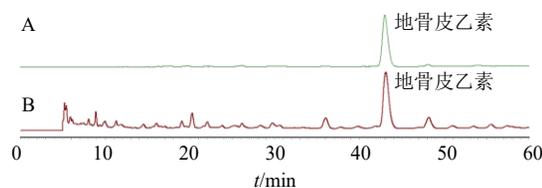


图 4 地骨皮乙素对照品 (A) 和泻白散基准样品 (B) 的 HPLC 图

Fig. 4 HPLC of kukoamine B reference substance (A) and Xiebai San benchmark sample (B)

2.4.4 线性关系考察 取不同质量浓度桑皮苷 A 对照品溶液。按“2.4.1”项下色谱条件进样分析，取不同质量浓度地骨皮乙素对照品溶液。按“2.4.2”项下色谱条件进样分析，以对照品质量浓度为横坐标 (X)，峰面积为纵坐标 (Y)，绘制标准曲线，桑皮苷 A 线性范围为 13.659~273.724 μg/mL，回归方程 $Y=26\ 804 X-27.036$ ， $R^2=0.999\ 9$ 。地骨皮乙素线性范围为 20.214~151.621 μg/mL，回归方程为 $Y=3\ 702.3 X-8.766\ 9$ ， $R^2=0.999\ 9$ 。结果表明桑皮苷 A、地骨皮乙素线性关系良好。

2.4.5 稳定性试验 按照“2.4.1”“2.4.2”项下方法制备供试品溶液，精密吸取 S1 供试品溶液 10 μL，分别在 0、2、4、8、12、24、48 h 注入液相色谱仪，依法测定，以桑皮苷 A、地骨皮乙素峰面积为指标，结果二者面积 RSD 值分别为 0.40% 和 0.76%。表明供试品溶液 48 h 内稳定性良好。

2.4.6 精密度试验 分别精密吸取 S1 供试品溶液 10 μL，注入液相色谱仪，连续进样 6 次，依法测定，记录峰面积，结果桑皮苷 A 和地骨皮乙素峰面积 RSD 值分别为 0.15% 和 0.19%。

2.4.7 重复性试验 精密称取 S1 样品共 6 份，分别按相应供试品溶液项下制备，依法测定，结果桑皮苷 A 质量分数的 RSD 为 1.47%，地骨皮乙素质

量分数的 RSD 为 1.62%。

2.4.8 加样回收率试验 取 9 份含量已知的样品约 0.1 g, 精密称定, 分别按 50%、100%、150% 水平加入对照品溶液, 分别按“2.4.1”“2.4.2”项下方法制备供试品溶液并测定, 计算加样回收率。测得桑皮苷 A 的平均加样回收率 99.61%, RSD 值为 1.01%; 地骨皮乙素的平均加样回收率 98.56%, RSD 值为 1.42%。

2.5 基准样品中指标成分含量及出膏率的测定

取制得的基准样品, 按“2.2”~“2.4”项下方法测定桑皮苷 A、地骨皮乙素含量以及出膏率, 实验结果见表 3。

表 3 基准样品中指标成分含量及出膏率

Table 3 Contents of index components and paste rates in benchmark samples

基准 样品	质量分数/(mg·g ⁻¹)		出膏 率/%
	桑皮苷 A	地骨皮乙素	
均值	41.70	14.86	13.92
上线	43.53	15.82	14.11
下线	40.86	11.30	12.76

2.6 泻白散现代提取工艺样品的制备

按泻白散处方的现代剂量^[11], 称取炒桑白皮 41.3 g、地骨皮 41.3 g、炒甘草 4.13 g, 另加粳米 28 g, 置于不锈钢锅中, 浸泡 30 min 后煎煮, 100 目滤布过滤, 70 °C 减压浓缩, 冷冻干燥即得泻白散现代工艺冻干粉并进行后续考察试验。

2.7 单因素考察加水量、提取时间、提取次数对提取效果的影响

2.7.1 加水量 称取处方饮片, 提取 2 次, 每次 90 min, 分别考察加 6、8、10、12、14 倍处方量水时 (1 倍量水约为 115 mL), 测定桑皮苷 A、地骨皮乙素含量以及出膏率, 结果见表 4, 桑皮苷 A 随着加水量的增多, 含量呈现先上升后下降趋势, 地骨皮乙素含量总体呈现下降趋势, 但地骨皮乙素含量在

表 4 加水量考察结果

Table 4 Results of water addition

加水量/ 倍	质量分数/(mg·g ⁻¹)		出膏 率/%
	桑皮苷 A	地骨皮乙素	
6	35.42	14.72	12.08
8	39.22	10.89	13.11
10	38.91	11.32	14.26
12	37.37	8.56	15.58
14	37.70	4.63	15.01

10 倍量水煎煮时较高, 故选用 8、10、12 倍量水煎煮进行后续响应曲面试验。

2.7.2 提取时间 取处方饮片, 加 10 倍量水, 提取 2 次, 分别考察 30、60、90、120 min 时, 桑皮苷 A、地骨皮乙素含量以及出膏率, 结果见表 5, 桑皮苷 A 和地骨皮乙素随着提取时间的增多, 含量较稳定, 成分趋于提取完全, 故选用 30、60、90 min 进行后续响应曲面试验。

表 5 提取时间考察结果

Table 5 Results of extraction time

提取时间/ min	质量分数/(mg·g ⁻¹)		出膏 率/%
	桑皮苷 A	地骨皮乙素	
30	42.72	14.63	13.86
60	38.99	13.42	14.26
90	39.42	11.24	13.47
120	38.13	10.58	13.84

2.7.3 提取次数 取处方饮片, 加 10 倍量水, 提取 90 min, 分别考察当提取次数为 1、2、3、4 次时, 桑皮苷 A、地骨皮乙素含量以及出膏率, 结果见表 6, 桑皮苷 A 和地骨皮乙素在提取 1、2、3 次时含量相差不多, 较提取 4 次高。故选用 1、2、3 次进行后续响应曲面试验。

表 6 提取次数考察结果

Table 6 Results of extraction times

提取 次数	质量分数/(mg·g ⁻¹)		出膏 率/%
	桑皮苷 A	地骨皮乙素	
1	38.96	12.56	9.74
2	38.98	11.28	14.26
3	39.14	9.75	16.75
4	32.73	5.13	20.13

2.8 BBD-RSM 试验设计优化提取工艺

2.8.1 关键质量属性和关键工艺参数的确定 结合泻白散的临床应用以及实际大生产工艺, 选择 2 个指标成分含量 (桑皮苷 A、地骨皮乙素) 指纹图谱相似度以及出膏率作为制剂工艺的关键质量属性 (critical quality attribute, CQA), 选择提取时间 (X_1)、提取次数 (X_2)、加水量 (X_3) 作为泻白散制剂工艺的关键工艺参数 (critical process parameters, CPP)。

2.8.2 BBD-RSM 实验设计 根据单因素试验结果确定各因素的范围, 利用 Design-Expert V13.0 软件, 进行 Box-Behnken 试验设计, BBD-RSM 实验设计见表 7。

表7 BBD-RSM 实验设计及样品提取结果

Table 7 Results of BBD-RSM experimental design and sample extraction

试验号	X ₁ / min	X ₂	X ₃ / 倍	桑皮苷 A/ (mg·g ⁻¹)	指纹图谱 相似度	出膏率/ %	地骨皮乙 素/(mg·g ⁻¹)	试验号	X ₁ / min	X ₂	X ₃ / 倍	桑皮苷 A/ (mg·g ⁻¹)	指纹图谱 相似度	出膏率/ %	地骨皮乙 素/(mg·g ⁻¹)
1	30	1	10	45.89	0.946	9.47	11.84	10	60	1	12	40.80	0.967	10.01	12.73
2	60	3	8	37.80	0.974	16.43	10.43	11	30	2	12	42.80	0.959	14.03	10.22
3	90	2	12	41.80	0.964	13.89	8.42	12	60	1	8	38.80	0.968	9.65	11.71
4	60	3	12	40.70	0.979	17.01	10.75	13	90	1	10	41.40	0.998	10.97	12.87
5	90	3	10	35.90	0.972	13.45	9.46	14	60	2	10	41.50	0.991	14.94	9.08
6	60	2	10	39.50	0.996	14.02	9.87	15	60	2	10	42.10	0.981	14.31	9.94
7	60	2	10	38.80	0.992	14.46	9.98	16	60	2	10	41.33	0.978	13.99	10.32
8	30	3	10	42.10	0.977	15.22	10.75	17	30	2	8	41.24	0.985	17.35	10.00
9	90	2	8	40.80	0.982	13.24	9.84								

2.8.3 评价指标的组合赋权

(1) FAHP 主观赋权: FAHP 是一种计算主观权重的方法,与层次分析法相比,FAHP 根据模糊数学理论,构造了更为符合人类思维模式的模糊一致判断矩阵^[12]。FAHP 的计算步骤如下。

步骤 1: 构建判断矩阵。按照古今君、臣、佐、使的原则^[13],结合各指标对实验的重要性进行排序。泻白散中桑白皮为君药,地骨皮为臣药,因桑皮苷 A 为君药中主要活性成分,地骨皮乙素为臣药中主要活性成分,故选用桑白皮中桑皮苷 A 和地骨皮中地骨皮乙素作为指标性成分,但前期课题组研究发现^[8],地骨皮乙素含量范围离散程度大,易受煎煮条件影响;指纹图谱涵盖信息广泛,其重要性大于出膏率。因此,各项指标的重要性顺序为桑皮苷 A>指纹图谱相似度>出膏率>地骨皮乙素。参考文献方法^[14]构建判断矩阵,根据 FAHP 理论判断矩阵,对同一层次内 *n* 个指标的相对重要性进行评分,得到模糊一致判断矩阵,结果见表 8~10。

表8 FAHP 构建模糊判断矩阵的标准

Table 8 Standard of constructing fuzzy judgment matrix by FAHP

标度	定义	说明
0.5	同等重要	2 个指标相比较,一样重要
0.6	稍微重要	2 个指标相比较,前者比后者稍微重要
0.7	明显重要	2 个指标相比较,前者比后者明显重要
0.8	强烈重要	2 个指标相比较,前者比后者强烈重要
0.9	极端重要	2 个指标相比较,前者比后者极端重要
0.1~0.4	相反比较	2 个指标相比较, $u_{ij}=1-u_{ji}$

u_{ij} 表示因素 *i* 相对于因素 *j* 的比较结果

u_{ij} represents the comparison result of factor *i* relative to factor *j*

表9 评价指标的模糊互补判断矩阵

Table 9 Fuzzy complementary judgment matrix of evaluation index

评价指标	标度			
	桑皮苷 A	指纹图谱相似度	出膏率	地骨皮乙素
桑皮苷 A	0.50	0.60	0.70	0.90
指纹图谱相似度	0.40	0.50	0.60	0.90
出膏率	0.30	0.40	0.50	0.80
地骨皮乙素	0.10	0.10	0.20	0.50

表10 评价指标的模糊一致判断矩阵

Table 10 Fuzzy consistent judgment matrix of evaluation index

评价指标	标度			
	桑皮苷 A	指纹图谱相似度	出膏率	地骨皮乙素
桑皮苷 A	0.50	0.54	0.59	0.73
指纹图谱相似度	0.46	0.50	0.55	0.69
出膏率	0.41	0.45	0.50	0.64
地骨皮乙素	0.28	0.31	0.36	0.50

步骤 2: 计算主观权重系数 (w_j^p) 并进行一致性检验。模糊互补判断矩阵的通用公式具有计算量小的优点,更适合实际应用^[15]。参考文献公式^[16]计算得到评价桑皮苷 A、指纹图谱相似度、出膏率和地骨皮乙素的 w_j^p 依次为 0.28、0.27、0.25、0.20。计算得到一致性指标 (I) = 0.04 < 0.1, 一致性检验通过。

(2) 熵权法客观赋权: 熵权法是根据数据提供的信息量来确定指标权重大小的方法。系统繁杂的程度用熵值表示,信息熵值越小,指标的差异越大,权重越大^[17]。熵值的计算步骤如下。

步骤 1: 创建原始数据矩阵并将其转换成概率矩阵。以桑皮苷 A、指纹图谱相似度和出膏率、地骨皮乙素 4 个指标为评价指标, 参考文献方法^[18-19]建立原始数据矩阵并转算成概率矩阵。

步骤 2: 计算指标信息熵 (H_j)。 H_j 越小, 数据就越离散, 它提供的信息就越多。

步骤 3: 计算客观权重系数 (w_j^q)。计算得到评价指标桑皮苷 A、指纹图谱相似度、出膏率和地骨皮乙素的 w_j^q 依次为 0.20、0.19、0.34、0.28。

(3) 组合赋权法: 组合权重是将 FAHP 主观经验和熵权法客观权重进行耦合, 运用乘法合成归一法计算评价指标的综合权重^[20], 根据公式 (1) 计算组合权重 (w_j^s), 结果见表 11。

$$w_j^s = w_j^p w_j^q / \sum_{j=1}^n w_j^p w_j^q \quad (1)$$

表 11 提取工艺评价指标的组合权重

Table 11 Combination weight of extraction process evaluation index

评价指标	w_j^p	w_j^q	w_j^s
桑皮苷 A	0.28	0.20	0.22
指纹图谱相似度	0.27	0.19	0.21
出膏率	0.25	0.34	0.34
地骨皮乙素	0.20	0.28	0.23

2.8.4 基准关联度的原理方法

步骤 1: 确定评价对象。SR 可用于评价现代制品与基准样品的一致性, 从而确定评价样本的指标数 (n) 和样本数 (m)^[21], 以桑皮苷 A、指纹图谱相似度、出膏率、地骨皮乙素 4 个指标为评价指标, Z_{ij} 表示响应面法的测量值, S_j 表示基准样品的测量值。

步骤 2: 计算相对偏差。 RD_{ij} 表示第 i 个样本在第 j 个指标下的相对偏差, 计算如式 (2) 所示值越小, 即在此条件下制得的药物质量与参比样品的相似性也会越高。

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

步骤 3: 计算基准关联度 (SR_{ij})。由于通过计算相对偏差得到的最优制备工艺会随着评价指标的变化而变化, 因此无法计算综合得分, 此时引入 SR_{ij} , 即以按古法制备的基准样品为标准值 (s), 响应面试验的样品为测得值 (x), 另外选取多种评价指标, 按公式 (3) 计算, 结果见表 12。

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

2.8.5 综合评分优化结果及验证实验 采用 FAHP-

表 12 基准关联度综合评分

Table 12 Benchmark correlation comprehensive score

试验号	SR_{ij}				综合评分
	桑皮苷 A	指纹图谱相似度	出膏率	地骨皮乙素	
1	0.90	0.946	0.68	0.80	81.11
2	0.91	0.974	0.82	0.70	84.41
3	1.00	0.964	1.00	0.57	89.15
4	0.98	0.979	0.78	0.72	85.12
5	0.86	0.972	0.97	0.64	86.85
6	0.95	0.996	0.99	0.66	90.79
7	0.93	0.992	0.96	0.67	89.43
8	0.99	0.977	0.91	0.72	89.77
9	0.98	0.982	0.95	0.66	89.72
10	0.98	0.967	0.72	0.86	85.99
11	0.97	0.959	0.99	0.69	91.11
12	0.93	0.968	0.69	0.79	82.49
13	0.99	0.998	0.79	0.87	89.51
14	1.00	0.991	0.93	0.61	88.27
15	0.99	0.981	0.97	0.67	90.82
16	0.99	0.978	0.99	0.69	92.14
17	0.99	0.985	0.75	0.67	83.54

主客观熵权法确定指标成分的权重系数, 可计算综合评分 = SR_{ij} 桑皮苷 A $\times 0.22 + SR_{ij}$ 指纹图谱相似度 $\times 0.21 + SR_{ij}$ 出膏率 $\times 0.34 + SR_{ij}$ 地骨皮乙素 $\times 0.23$, 结果见表 12。以综合评分最接近 100 为最优提取参数, 将对应的基准关联度综合评分输入响应面软件中, 根据方差分析结果, 2 次多项式模型显著, 而失拟项不显著, 说明该模型具有统计学意义。其中 X_1 和 X_3 的 $P < 0.05$, 表明提取时间和加水倍数对综合评分的影响显著。各因素的影响顺序为加水倍数 $>$ 提取时间 $>$ 提取次数; $X_1 X_2$ 的 $P < 0.01$, X_1 和 X_3 的 $P < 0.5$, 表明提取时间和提取次数交互作用极显著, 加水倍数和提取次数交互作用显著。方差分析见表 13, 响应面分析见图 5。

最终综合评分模型预测的最佳提取工艺为加 10 倍水量, 煎煮 2 次, 每次 90 min, 得到的样品关键质量属性与基准样品煎液最相似, 质量最为一致。最后选择最优提取工艺进行 3 批验证试验, 测定桑皮苷 A、指纹图谱相似度、出膏率、地骨皮乙素, 结果见表 14。3 批验证实验综合评分都在 98 以上, 且 RSD 值为 0.37%, 表明提取工艺条件较为稳定, 具有可行性。

表 13 Box-Behnken 设计方差分析结果

Table 13 Results of Box-Behnken design of variance analysis

误差来源	偏差平方和	自由度	F 值	P 值	显著性	误差来源	偏差平方和	自由度	F 值	P 值	显著性
模型	163.660	9	9.790	0.003 3	极显著	X_2X_3	1.950	1	1.050	0.340 2	
X_1	11.760	1	6.330	0.040 1	显著	X_1^2	0.167	1	0.090	0.773 5	
X_2	6.210	1	3.340	0.110 2		X_2^2	56.980	1	30.660	0.000 9	极显著
X_3	15.710	1	8.450	0.022 7	显著	X_3^2	18.720	1	10.080	0.015 6	显著
X_1X_2	32.040	1	17.240	0.004 3	极显著	失拟项	4.230	3	0.643	0.626 4	不显著
X_1X_3	16.560	1	8.910	0.020 4	显著						

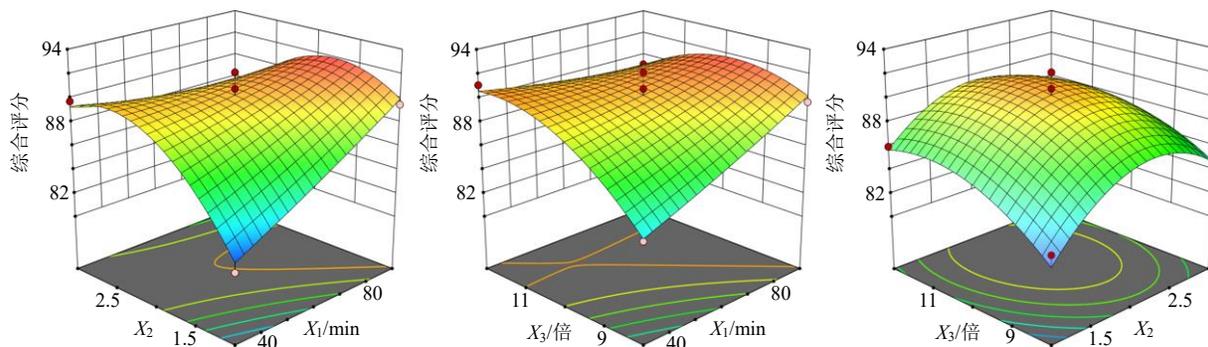


图 5 各因素 X_1 、 X_2 、 X_3 对综合评分影响的响应面及等高线图

Fig. 5 Response surface and contour map of effect of various factors X_1 , X_2 , and X_3 on comprehensive score

表 14 工艺验证结果

Table 14 Process verification results

序号	桑皮苷 A/(mg·g ⁻¹)	指纹图谱相似度	出膏率/%	地骨皮乙素/(mg·g ⁻¹)	综合评分	RSD/%
1	41.61	0.998	14.03	14.35	98.85	
2	42.22	0.994	13.91	13.93	98.14	0.37
3	41.74	0.992	14.15	14.26	98.32	

3 讨论

泻白散作为治疗小儿咳喘的代表性方剂，具有较好的抗氧化作用^[22]，在防治肺部疾病方面具有显著疗效^[23-24]，目前，关于泻白散制剂研究报道极少，在提取工艺方面有文献报道，超声或微波提取对于行业大生产来说成本较高，现代煎煮法更具成本效益，更适合生产实践^[25]，也更能符合临床上的大量需求。为了更加贴合古方工艺，适应现代实际大生产，本研究采用水煎煮进行提取工艺研究，以君药和臣药的水溶性物质桑皮苷 A 和地骨皮乙素为成分指标，对加水量、提取时间、提取次数进行单因素考察。在干燥方式上，为了得到质量稳定的基准样品，本研究选用冻干粉形式，并将泻白散标准煎液和所得冻干粉进行比较，冷冻干燥工序并未影响成分的含量。

关于制剂提取工艺的设计，近年来，响应面法已被广泛应用^[26-28]，为了使拟合结果可靠，本研究

首先利用单因素试验确定响应范围，再选用桑皮苷 A、地骨皮乙素、指纹图谱相似度、出膏率为考察指标进行响应面实验，该关键质量属性能很大程度反映样品的全面特征。对于基准样品中甘草成分研究，综合考虑甘草为佐使药且用量与桑白皮和地骨皮比相差较悬殊，同时基准样品指纹图谱中甘草信息较全，故考虑甘草暂不作为基准样品含量测定质量控制主要指标，课题组后期还会进一步完善优化工艺。

本研究在本着与基准样品一致的原则，采用了一种新型评价分析方法—模糊层次分析法，FAHP 是一种由模糊和层次分析相结合的赋权方法，此方法优化了层次分析法，提高了评价的可靠性^[29]，并结合主客观熵权分析法，最后引入古法与现代工艺的桥梁—基准关联度法进行综合评分的计算，按照综合评分接近 100 的标准，优选出最佳提取工艺条件为加 10 倍水量，煎煮 2 次，每次 90 min。经 3 批验证，该样品质量与古代更加相似，工艺更为可

靠。多种方法联用能更全面、合理地评价现代工艺,以期能够全面地体现古今制剂量值传递过程中的科学性,本研究完成了泻白散由古法制备到现代企业生产的关键一步,符合 QbD 以及“守正创新”的理念,为泻白散未来的进一步开发提供了有利价值。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 钱乙. 小儿药证直诀 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2018: 1, 17.
- [2] 国家中医药管理局. 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]. [2018-04-13]. <http://kjs.satcm.gov.cn/zhengcewenjian/2018-04-16/7107.html>.
- [3] 李玉丽, 易腾达, 谭志强, 等. 经典名方泻白散的源流及古今应用考究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(4): 168-174.
- [4] 李玉丽. 经典名方泻白散方义衍变及本草考证探究 [D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2020.
- [5] 王晶波, 熊丽琼. 中医药治疗哮喘的研究概述 [J]. 辽宁中医杂志, 2022, 49(4): 218-220.
- [6] 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]. (2020-10-12) [2021-11-04]. <https://www.cde.org.cn/main/news/viewInfoCommon/1c18dd163e7c9221786e5469889367d0.html>.
- [7] 方妍. 经典名方泻白散标准汤剂的研究 [D]. 吉林: 长春中医药大学, 2020.
- [8] 刘滢, 董金香, 高原, 等. 基于指纹图谱和量值传递优化泻白散标准煎液制备工艺 [J]. 时珍国医国药, 2022, 33(1): 125-129.
- [9] 贾德强, 贺成柱, 丁立利. AHP-熵权法结合 Box-Behnken 响应面法优化当归微波真空干燥工艺研究 [J]. 中国农机化学报, 2023, 44(2): 60-68.
- [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] 高原. 经典名方泻白散物质基准制备工艺及质量标准研究 [D]. 吉林: 长春中医药大学, 2021.
- [12] 张良达. 基于假设检验和模糊层次分析法的 MATLAB 实现及应用 [J]. 产业与科技论坛, 2017, 16(22): 39-41.
- [13] 陈炬, 庞尧斌, 郭静. 基于源流探析君臣佐使配伍法 [J]. 湖南中医杂志, 2022, 38(3): 91-93.
- [14] Liu W T, Zheng Q S, Pang L F, et al. Study of roof water inrush forecasting based on EM-FAHP two-factor model [J]. *Math Biosci Eng*, 2021, 18(5): 4987-5005.
- [15] 彭涛, 魏伟, 崔崔, 等. 基于双重熵值修正指标赋权的电网接收用户资产综合价值评估方法 [J]. 现代电力, 2022, 39(6): 694-701.
- [16] 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.
- [17] 黄玉宇, 陈汀, 沈晗, 等. 茵陈蒿汤煎煮工艺的优化 [J]. 中成药, 2021, 43(5): 1135-1140.
- [18] 涂正伟, 刘洪斌, 韩忠耀, 等. 基于信息熵赋权法的正交试验优化番石榴叶总黄酮提取工艺 [J]. 中草药, 2019, 50(21): 5260-5265.
- [19] 刘红雨, 刘友存, 孟丽红, 等. 熵权法在水资源与水环境评价中的研究进展 [J]. 冰川冻土, 2022, 44(1): 299-306.
- [20] 张英. 基于模糊层次分析-模糊综合评价模型的应用研究 [D]. 安庆: 安庆师范大学, 2022.
- [21] 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.
- [22] 李莉, 文旺, 周垚垚, 等. 泻白散及其主药体外抗氧化活性研究 [J]. 药物评价研究, 2020, 43(10): 2009-2014.
- [23] 徐明远, 郭晓瑞, 刘佳, 等. 基于网络药理学和动物模型验证研究泻白散治疗新型冠状病毒肺炎的潜在作用 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2022, 24(9): 3394-3405.
- [24] 李春盈, 王秀兰, 杨振宇. 麻杏泻白散加减对慢性阻塞性肺疾病急性加重期痰热阻肺型患者 MMP-9、sTREM-1、IL-6 及营养指标的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2022, 37(4): 2371-2375.
- [25] 王欢欢, 唐璇, 许静, 等. 半夏厚朴汤古法煎煮与现代煎煮的差异研究 [J]. 时珍国医国药, 2020, 31(10): 2386-2389.
- [26] 赵敏, 战祥, 徐茜, 等. 响应面法优化五倍子多酚的提取工艺 [J]. 湖北大学学报: 自然科学版, 2023, 45(2): 294-300.
- [27] 蒲立立, 徐伟, 范润勇, 等. 基于熵权法结合 Box-Behnken 响应面法优化大黄牡丹颗粒提取工艺 [J]. 中国现代中药, 2023, 25(2): 375-381.
- [28] 张梅, 况刚, 张有金, 等. 基于设计空间法优化北刘寄奴-骨碎补的提取工艺研究 [J]. 中草药, 2022, 53(8): 2341-2347.
- [29] 孙铭忆, 李冰韶, 王永洁, 等. 基于模糊层次分析法优选复方黄芪水浸膏提取工艺路线 [J]. 中草药, 2018, 49(2): 325-329.

[责任编辑 郑礼胜]