

基于基准关联度和熵权-优劣解距离法综合评价优选经典名方血府逐瘀汤提取工艺

黄燕^{1,2}, 罗飞³, 何洲峰³, 付文芮¹, 黄雪艳¹, 彭倩^{1,2}, 果茵茵², 魏舒畅^{1*}

1. 甘肃中医药大学, 甘肃省中药制药工艺工程研究中心, 陇药产业创新研究院, 甘肃 兰州 730000

2. 兰州大学第二医院(第二临床医学院), 甘肃 兰州 730030

3. 兰州大学第二临床医学院, 甘肃 兰州 730000

摘要: 目的 筛选经典名方血府逐瘀汤(Xuefu Zhuyu Decoction, XZD)的最优醇提工艺,使其能保留传统水提样品中的小分子物质,为透皮制剂开发提供实验依据。方法 以XZD中12种活性成分(腺苷、梓醇、苦杏仁苷、羟基红花黄色素A、芍药苷、阿魏酸、甘草苷、芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、甘草酸)含量、出膏率及指纹图谱相似度作为关键质量属性(critical quality attributes, CQAs);以乙醇体积分数、提取时间、溶剂倍数作为关键工艺参数(critical process parameters, CPPs),采用Box-Behnken设计-响应面法(Box-Behnken design-response surface methodology, BBD-RSM)开展试验。计算各试验样品指标的基准关联度,通过熵权法确定各CQAs的权重并计算综合评分;运用TOPSIS模型计算各XZD样品与其基准样品的相对接近度并排序,结合综合评分筛选最佳醇提工艺。此外,采用超高效液相色谱-四级杆-飞行时间质谱技术(UPLC-Q-TOF-MS/MS)对XZD基准样品与其最优醇提工艺样品的化学成分进行表征,进一步验证小分子物质的保留效果。结果 经熵权-TOPSIS模型分析,确定XZD最优醇提工艺为10倍量60%乙醇,提取3h。3批验证样品的综合评分均值达0.501, RSD为0.75%,符合要求,证实该工艺稳定、方法适用。同时,UPLC-Q-TOF-MS/MS分析表明,XZD最优工艺样品与其基准样品的主要化学成分组成相似。结论 基于基准关联度与熵权-TOPSIS模型的综合筛选策略可行有效,所得XZD醇提工艺参数稳健可靠,能有效保留基准煎液的小分子物质,化学物质基础与基准煎液相似,可为XZD透皮制剂研发提供参考。

关键词: 血府逐瘀汤;质量源于设计;基准关联度;熵权法-TOPSIS模型;指纹图谱;Box-Behnken设计-响应面法;UPLC-Q-TOF-MS/MS

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2026)10-3764-14

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.10.009

Optimization of extraction process for classical prescription Xuefu Zhuyu Decoction based on standard relation and entropy weight-TOPSIS method

HUANG Yan^{1,2}, LUO Fei³, HE Zhoufeng³, FU Wenrui¹, HUANG Xueyan¹, PENG Qian^{1,2}, GUO Yinyin², WEI Shuchang¹

1. Gansu University of Traditional Chinese Medicine, Gansu Province Traditional Chinese Medicine Pharmaceutical Technology Engineering Research Center, Longyao Industry Innovation Research Institute, Lanzhou 730000, China

2. The Second Hospital & Clinical Medical School, Lanzhou University, Lanzhou 730030, China

3. The Second Clinical Medical School, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China

Abstract: Objective To select the optimal alcohol extraction process for the classic prescription Xuefu Zhuyu Decoction (XZD, 血府逐瘀汤), enabling the retention of small-molecule substances in traditional aqueous extracts, thereby providing experimental basis for the development of transdermal formulations. **Methods** The contents of 12 active components (adenosine, catalpol, amygdalin, hydroxysafflor yellow A, paeoniflorin, ferulic acid, liquiritin, narirutin, naringin, hesperidin, neohesperidin, glycyrrhizic acid) in XZD, the extract yield, and the fingerprint similarity were used as critical quality attributes (CQAs). Ethanol concentration, extraction time,

收稿日期: 2025-12-16

基金项目: 国家自然科学基金项目(82060721); 甘肃省自然科学基金项目(23JRRA1623); 甘肃省自然科学基金项目(23JRRA1622)

作者简介: 黄燕(1986—), 博士研究生, 副主任中药师, 研究方向为中药制剂工艺研究。E-mail: 553698621@qq.com

*通信作者: 魏舒畅, 教授, 博士生导师, 从事中药制剂工艺研究。E-mail: wshch006@163.com

and solvent ratio were selected as critical process parameters (CPPs), and experiments were conducted using a Box-Behnken design-response surface methodology (BBD-RSM). The benchmark correlation degree of each experimental sample index was calculated, and the weights of each CQA were determined using the entropy weight method to compute a comprehensive score. The TOPSIS model was applied to calculate the relative closeness of each sample to the benchmark sample and rank them, with the optimal alcohol extraction process screened based on the comprehensive score. Additionally, ultra-performance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry (UPLC-Q-TOF-MS/MS) was used to description the chemical components of the benchmark sample and the optimal alcohol extraction process sample, further verifying retention effect of small-molecule components..

Results Analysis using the entropy weight-TOPSIS model determined the optimal alcohol extraction process for XZD as follows: ten times the amount of 60% ethanol, with each extraction lastin 3 h. The average comprehensive score of three validation samples reached 0.501, with RSD of 0.75%, which met the requirements and confirmed that the process was stable and the method was applicable. Meanwhile, UPLC-Q-TOF-MS/MS analysis showed that the main chemical composition of the optimal process sample were similar to those of the benchmark sample. **Conclusion** The comprehensive screening strategy based on the benchmark correlation degree and entropy weight-TOPSIS model is feasible and effective. The obtained XZD alcohol extraction process parameters are robust and reliable, and the small molecule substances of the benchmark decoction can be effectively retained. The chemical substance basis is similar to that of the benchmark decoction. This study can provide a reference for the research and development of XZD transdermal formulations.

Key words: Xuefu Zhuyu Decoction; quality by design; standard relation; entropy weight-TOPSIS model; fingerprint; Box-Behnken design response surface methodology; UPLC-Q-TOF-MS/MS

血府逐瘀汤 (Xuefu Zhuyu Decoction, XZD) 源自清代·王清任《医林改错》，由桃仁、红花、当归等 11 味中药材组成，具有活血化瘀、行气止痛之效^[1]，其临床应用范围已拓展至冠心病、血管及外伤性头痛等领域，原发性痛经 (primary dysmenorrhea, PD) 更是其在妇科疾病中的重要应用方向^[2-4]。现代药理研究表明，XZD 具有促进血管生成、抑制胶原沉积、神经保护及抗炎等多种作用^[5]，这些作用可通过改善子宫微循环、减轻局部炎症反应、缓解子宫平滑肌痉挛等途径，调控原发性痛经的病理生理过程。中医认为，PD 的病机为“不通则痛”或“不荣则痛”，其中气滞血瘀证常见^[6]。XZD 作为治疗气滞血瘀证的代表性方剂，其活血化瘀、行气止痛之功符合 PD 病机的治疗原则^[7]，故为临床治疗该证型痛经的常用方剂之一。

经典名方研发已成为近年中药新药研究热点，核心目标是在传承原方临床疗效的基础上，通过剂型改良、工艺优化等手段，提升使用便利性与质量稳定性，推动经典名方的现代化转化。XZD 药材组成复杂，药效依赖多组分体系，多靶点特性需多指标综合评价药效物质基础^[8-9]，也为工艺优化与质控带来挑战。XZD 的活性成分群包括黄酮类、有机酸类、萜类、生物碱类等，乙醇提取契合 XZD 活性成分的理化性质和溶解度。

通过醇提工艺筛选可高效保留水提液中小分子有效成分，适配透皮制剂的剂型改造需求。基于

质量源于设计 (quality by design, QbD) 理念^[10]，采用 Box-Behnken 设计-响应面法 (Box-Behnken design-response surface methodology, BBD-RSM) 优化醇提关键工艺参数 (critical process parameters, CPPs)，引入基准关联度 (standard relation, SR)^[11] 结合熵权-TOPSIS 模型综合评价^[12]，以多指标成分定量、指纹图谱相似度、出膏率计算综合得分筛选最优提取方案。同时通过超高效液相色谱-四极杆-飞行时间串联质谱 (ultra-performance liquid chromatography-quadrupole-time-of-flight tandem mass spectrometry, UPLC-Q-TOF-MS/MS) 技术，对水提基准样品与最优醇提样品进行系统化学成分表征，重点分析小分子成分留存情况及物质组成差异^[13]，为工艺筛选提供直接化学依据。本研究最终筛选出可最大化保留水提小分子有效成分、贴合传统水提工艺特征的醇提工艺参数，也为 XZD 透皮制剂的开发奠定坚实基础。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Aglient 1100 型高效液相色谱仪，安捷伦科技有限公司；XSZ205 型电子天平，梅特勒-托利多仪器 (上海) 有限公司；Vanquish 型超高效液相色谱仪、Orbitrap Exploris 120 型高分辨质谱，美国 Thermo Fisher Scientific Inc.；HH-S6 型恒温水浴锅，江苏正基仪器有限公司；TG18-WS 型台式高速离心机，河南信陵仪器设备有限公司；MH-1000 型电子调温电

热套,北京中仪泓瑞科技发展有限公司。

1.2 对照品及试剂

对照品阿魏酸(批号 101053)、新橙皮苷(批号 102778)、柚皮苷(批号 100005)、芸香柚皮苷(批号 MUST-24070406)、梓醇(批号 101669)、橙皮苷(批号 200134-220505)、芍药苷(批号 102773)、甘草苷(批号 101182)、甘草酸(批号 YJ0085)、苦杏仁苷(批号 104104-221202)、羟基红花黄色素 A(批号 HB0053)、腺苷(批号 MUST-23121115)质量分数均 $\geq 98.0\%$,均购自江苏永健医药科技有限公司;无水甲醇(批号 20250426036)、无水乙醇(批号 20241019)、甲酸(批号 20240825)、磷酸(批号 20240825)均为分析纯,购自国药集团化学试剂有限公司;色谱纯甲醇(批号 I1406607)、乙腈(批号 1605226A)均购自德国默克集团;水为蒸馏水。

1.3 饮片

饮片各 3 批,购于安徽省万生中药饮片有限公司,经甘肃中医药大学药学院魏舒畅教授鉴定为正品,其中,桃仁为蔷薇科桃属植物桃 *Prunus persica* (L.) Batsch 的干燥成熟种子,产地甘肃;红花为菊科红花属植物红花 *Carthamus tinctorius* L. 的干燥花,产地新疆;当归为伞形科当归属植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels 的干燥根,产地甘肃;生地黄为玄参科地黄属植物地黄 *Rehmannia glutinosa* Libosch. 的干燥块根,产地河南;牛膝为苋

科牛膝属植物牛膝 *Achyranthes bidentata* Bl. 的干燥根,产地河南;川芎为伞形科川芎属植物川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort. 的干燥根茎,产地四川;桔梗为桔梗科桔梗属植物桔梗 *Platycodon grandiflorum* (Jacq.) A. DC. 的干燥根,产地河北;赤芍为毛茛科芍药属植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 的干燥根,产地内蒙古;枳壳为芸香科柑橘属植物酸橙 *Citrus aurantium* L. 及其栽培变种的干燥未成熟果实;甘草为豆科甘草属植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根和根茎,产地甘肃;柴胡为伞形科柴胡属植物柴胡 *Bupleurum chinense* DC. 的干燥根,产地陕西。

2 方法与结果

2.1 XZD 基准煎液的制备

称取处方药材(桃仁 12 g, 红花、当归、生地黄、牛膝各 9 g, 川芎、桔梗各 4.5 g, 赤芍、枳壳、甘草各 6 g, 柴胡 3 g)于陶瓷锅中,加水 1 000 mL,浸泡 30 min,武火加热沸腾,文火煎煮约 60 min,趁热双层纱布滤过,药渣加水 800 mL,武火煮沸后继续文火煎煮约 60 min,趁热双层纱布滤过,将 2 次煎煮药液混合,浓缩至 200 mL,得 XZD 基准煎液样品^[14]。采用随机数字表法,随机分配饮片的批号,按处方组合饮片,制备 15 批样品(S1~S15),经上述方法提取,即得 XZD 基准煎液。各样品批号组成见表 1。

表 1 XZD 基准样品编号与饮片批号的对应关系

Table 1 Corresponding relationship between XZD benchmark sample numbers and batch numbers of decoction pieces

编号	饮片批号										
	炒桃仁	红花	当归	生地黄	川芎	赤芍	牛膝	桔梗	柴胡	枳壳	甘草
S1	2308006	240315	20230904	2308009	D2311096	231206	240916	2307002	202408007	230816	20231103
S2	2404016	240623	20230502	20220808	D2308009	231110	231104	241015	202312007	240718	20230601
S3	2204008	230128	20230804	2402019	D2406024	230601	240601	2403004	202308004	240318	20230904
S4	2308006	240315	20230904	20220808	D2406024	231206	240916	241015	202308004	230816	20231103
S5	2404016	230128	20230502	2308009	D2311096	230601	231104	2307002	202408007	240718	20230904
S6	2204008	240623	20230804	2402019	D2308009	231110	240601	2403004	202312007	240318	20230601
S7	2308006	240623	20230502	20220808	D2406024	231206	231104	241015	202408007	240718	20230904
S8	2404016	240315	20230904	2308009	D2311096	230601	240916	2307002	202312007	230816	20230601
S9	2204008	230128	20230804	2402019	D2308009	231110	240601	2403004	202308004	240318	20231103
S10	2308006	240623	20230502	2308009	D2311096	231206	231104	241015	202408007	240718	20230601
S11	2404016	230128	20230904	20220808	D2406024	230601	240916	2307002	202308004	230816	20230904
S12	2204008	240315	20230804	2402019	D2308009	231110	240601	2403004	202312007	240318	20231103
S13	2308006	240315	20230502	20220808	D2311096	231206	240601	241015	202312007	240718	20230601
S14	2404016	240623	20230804	2308009	D2406024	230601	231104	2307002	202408007	230816	20230904
S15	2204008	230128	20230904	2402019	D2311096	231110	240916	2403004	202308004	240318	20231103

2.2 XZD 基准煎液指纹图谱的建立及相似度评价

2.2.1 色谱条件 色谱柱为 Phenomenex Gemini NX C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为 0.1%磷酸水溶液-甲醇 (99:1, A)-乙腈 (B), 梯度脱洗: 0~8 min, 100% A; 8~13 min, 100%~95% A; 13~30 min, 95% A; 30~38 min, 95%~85% A; 38~50 min, 85% A; 50~68 min, 85%~72% A; 68~78 min, 72%~50% A; 78~78.1 min, 50%~100% A; 78.1~85 min, 100% A; 柱温 40 °C; 体积流量 1.0 mL/min; 进样量 10 μL, 检测波长 210 nm。

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称定对照品腺苷、梓醇、苦杏仁苷、羟基红花黄色素 A、芍药苷、阿魏酸、甘草苷、芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、甘草酸, 加入 50%甲醇制成质量浓度分别为 825.0、1 650.0、1 110.0、1 160.0、1 335.0、682.5、517.5、720.0、507.5、625.0、452.5、1 610.0 μg/mL 的混合对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备 精密吸取 XZD 基准煎液, 置于离心管中, 10 000 r/min 离心 (离心半径 6.5 cm) 5 min, 取上清液, 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得供试品溶液。

2.2.4 单味饮片溶液 取赤芍、川芎、当归、甘草、红花、生地黄、桃仁、枳壳药材, 分别按照其处方量称重, 按照“2.1”项下方法制备, 作为各单味饮片溶液, 备用。

2.2.5 阴性样品溶液的制备 按照处方分别制备缺赤芍、川芎、当归、甘草、红花、生地黄、桃仁、枳壳的阴性样品, 按照“2.1”项下方法制备, 即得阴性样品溶液, 备用。

2.2.6 精密度试验 取 S1 基准煎液, 按照“2.2.1”项下色谱条件, 连续进样测定 6 次, 选择分离度好、峰面积稳定且为供试品中主要指标性成分的 16 号峰 (芍药苷) 为参照峰, 计算得到各共有峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均小于 2.88%, 表明该方法精密度良好。

2.2.7 稳定性试验 取 S1 基准煎液, 按照“2.2.3”项下方法制备供试品溶液, 按照“2.2.1”项色谱条件, 分别于制备后 0、2、4、8、12、24 h 进样测定, 以 16 号峰 (芍药苷) 为参照峰, 计算得到各共有峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均小于 2.98%, 结果表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.2.8 重复性试验 取 S1 基准煎液, 按照“2.2.3”

项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 按照“2.2.1”项下色谱条件进样测定, 以 16 号峰 (芍药苷) 为参照峰, 计算得到各共有峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均小于 2.65%, 结果表明, 该方法重复性良好。

2.2.9 基准煎液指纹谱图的建立与相似度分析 将 XZD 基准煎液 (S1~S15) 的 HPLC 谱图 (cdf 格式), 导入 2012 年版《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》进行分析评价, 以 S1 的指纹图谱作为参照图谱, 设置时间窗宽度为 0.1 s, 采用中位数法进行多点校正和标记 (Mark) 峰匹配, 建立叠加指纹图谱和对照指纹图谱, 共发现 28 个共有峰 (图 1)。以生成的对照指纹图谱 (R) 为参照图谱, 采用相同软件计算各批次供试品与对照图谱的相似度, 结果 S1~S15 的相似度分别为 0.987、0.975、0.977、0.988、0.991、0.991、0.978、0.975、0.963、0.982、0.981、0.966、0.983、0.967、0.964, 均大于 0.950。结果表明, 15 批 XZD 基准煎液化学成分基本稳定, 生成的对照指纹图谱具有很好的代表性。通过对比对照品与供试品的色谱峰保留时间 (图 2) 及紫外吸收光谱图, 成功指认 12 个特征峰, 分别为 2 号腺苷、5 号梓醇、11 号苦杏仁苷、15 号羟基红花黄色素 A、16 号芍药苷、19 号阿魏酸、20 号甘草苷、22 号芸香柚皮苷、23 号柚皮苷、24 号橙皮苷、25 号新橙皮苷和 28 号甘草酸。

2.3 指标性成分的含量测定

2.3.1 色谱条件 同“2.2.1”项下, 典型色谱图见图 2。

2.3.2 供试品溶液的制备 同“2.2.3”项下。

2.3.3 专属性试验 精密吸取供试品溶液、单味饮片溶液及阴性样品溶液, 按照“2.2.1”项下色谱条件进样测定。结果显示, 供试品溶液在各成分相应位置均出现与保留时间对应的色谱峰 (图 3), 表明该方法专属性良好, 符合试验要求。

2.3.4 线性关系考察 取“2.2.2”项下混合对照品溶液, 用 50%甲醇稀释制备系列质量浓度溶液, 按照“2.2.1”项下色谱条件进样测定, 各质量浓度平行 3 次。以质量浓度 (X) 对峰面积 (Y) 进行线性回归, 得到回归方程、相关系数 (r) 和线性范围, 结果分别为腺苷 $Y=7\,045.00X-24.780$, $r=0.9998$, 线性范围 20.6~825.0 μg/mL; 梓醇 $Y=1\,623.00X+11.669$, $r=0.9999$, 线性范围 16.5~1 650.0 μg/mL; 苦杏仁苷 $Y=9\,131.00X+27.412$, $r=0.9999$, 线性

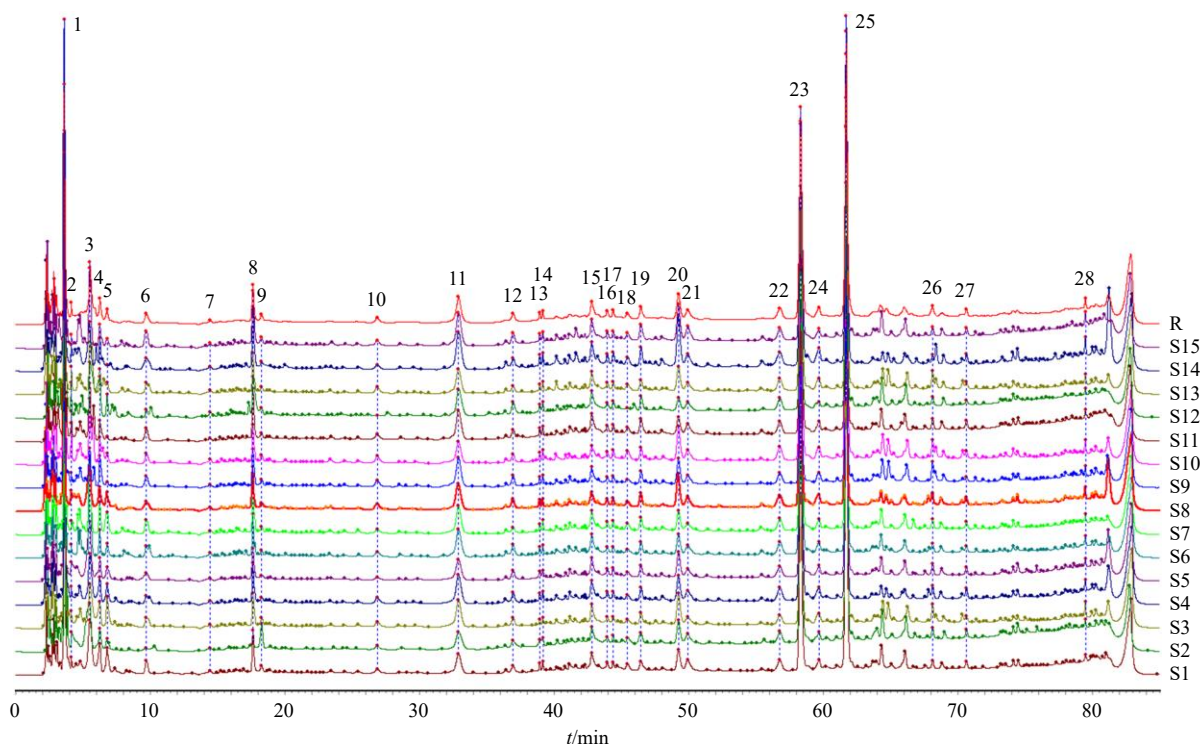
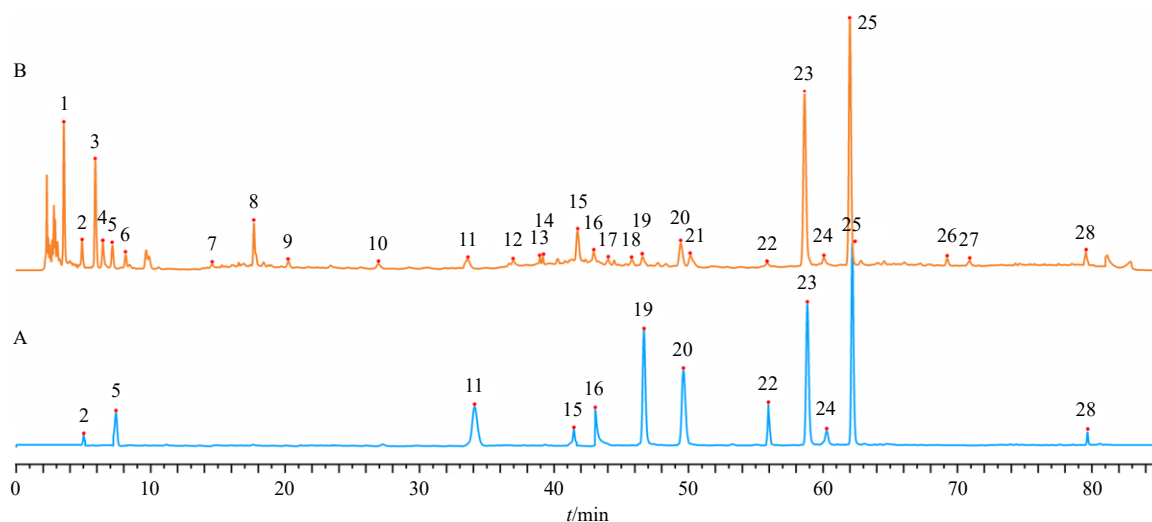


图1 15批XZD基准样品HPLC指纹图谱

Fig. 1 HPLC fingerprints of 15 batches of XZD benchmark samples



2-腺苷; 5-梓醇; 11-苦杏仁苷; 15-羟基红花黄色素 A; 16-芍药苷; 19-阿魏酸; 20-甘草苷; 22-芸香柚皮苷; 23-柚皮苷; 24-橙皮苷; 25-新橙皮苷; 28-甘草酸。

2-adenosine; 5-catalpol; 11-amygdalin; 15-hydroxysafflor yellow A; 16-paeoniflorin; 19-ferulic acid; 20-liquiritin; 22-rutin naringin; 23-naringin; 24-hesperidin; 25-neohesperidin; 28-glycyrrhizic acid.

图2 混合对照品 (A) 和 XZD 基准样品 (B) 的 HPLC 图

Fig. 2 HPLC fingerprints of mixed reference substances (A) and XZD benchmark sample (B)

范围 11.1~110.0 $\mu\text{g/mL}$; 羟基红花黄色素 A $Y=3323.50X-45.663$, $r=0.9996$, 线性范围 29.0~1160.0 $\mu\text{g/mL}$; 芍药苷 $Y=3964.10X+26.935$, $r=0.9998$, 线性范围 33.4~1335.0 $\mu\text{g/mL}$; 阿魏酸 $Y=30405.00X-81.597$, $r=0.9998$, 线性范围 6.8~

682.5 $\mu\text{g/mL}$; 甘草苷 $Y=33005.00X+103.800$, $r=0.9999$, 线性范围 5.2~517.5 $\mu\text{g/mL}$; 芸香柚皮苷 $Y=25036.00X+53.099$, $r=0.9996$, 线性范围 18.0~720.0 $\mu\text{g/mL}$; 柚皮苷 $Y=27503.00X+34.277$, $r=0.9998$, 线性范围 5.1~507.5 $\mu\text{g/mL}$; 橙

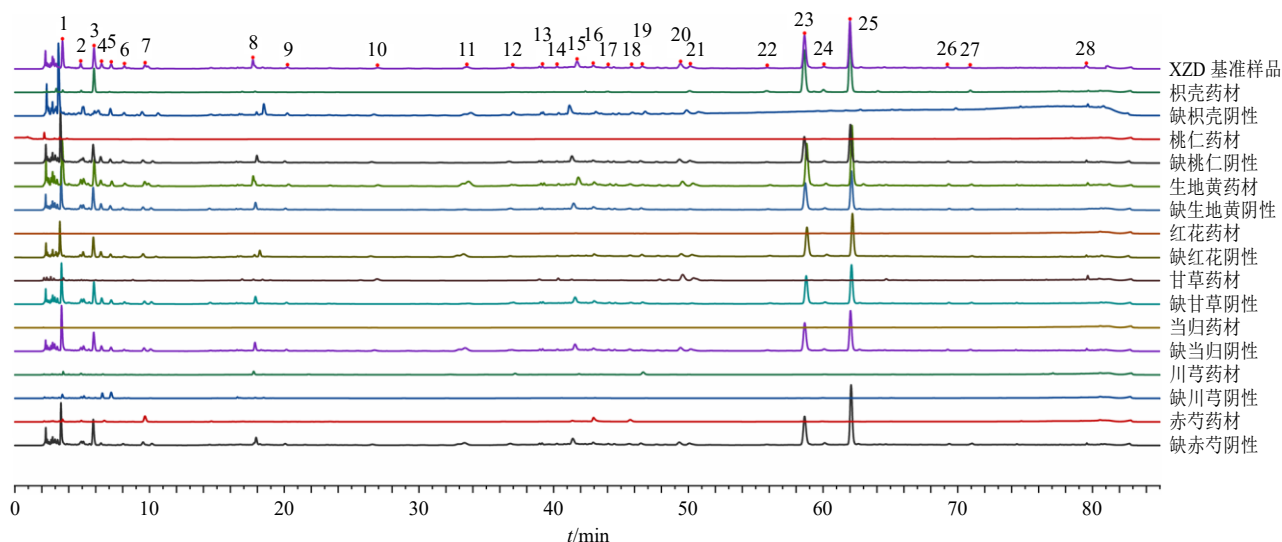


图3 XZD 基准样品、单味药材及缺味阴性样品的叠加 HPLC 图

Fig. 3 Overlay HPLC chromatograms of XZD benchmark samples, single medicinal materials and missing-ingredient negative samples

皮苷 $Y=4\ 074.60X-142.760$, $r=0.999\ 6$, 线性范围 48.0~720.0 $\mu\text{g/mL}$; 新橙皮苷 $Y=34\ 004.00X+101.560$, $r=0.999\ 8$, 线性范围 8.0~802.5 $\mu\text{g/mL}$; 甘草酸 $Y=1\ 376.30X-363.220$, $r=0.999\ 6$, 线性范围 107.3~1\ 610.0 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.3.5 精密度试验 取 S1 基准煎液, 按照“2.2.1”项下色谱条件, 连续进样测定 6 次, 记录峰面积并计算其 RSD, 结果腺苷、梓醇、苦杏仁苷、羟基红花黄色素 A、芍药苷、阿魏酸、甘草苷、芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、甘草酸峰面积的 RSD 分别为 1.99%、2.82%、0.31%、1.50%、1.02%、0.74%、0.17%、1.03%、1.25%、2.38%、0.90%、2.24%, 表明该仪器的精密度良好。

2.3.6 稳定性试验 取 S1 基准煎液, 室温放置, 按照“2.2.1”项下色谱条件, 分别于制备后 0、2、4、8、12、24 h 进样分析, 记录各成分峰面积并计算 RSD, 结果腺苷、梓醇、苦杏仁苷、羟基红花黄色素 A、芍药苷、阿魏酸、甘草苷、芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、甘草酸峰面积的 RSD 分别为 0.73%、1.25%、2.62%、2.10%、0.64%、0.94%、0.82%、0.62%、0.96%、2.16%、1.37%、2.62%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.3.7 重复性考察 取 S1 基准煎液, 按照“2.2.3”项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 按照“2.2.1”项下色谱条件进样分析, 记录峰面积并计算其 RSD, 结果腺苷、梓醇、苦杏仁苷、羟基红花黄色素 A、芍药苷、阿魏酸、甘草苷、芸香柚皮苷、柚

皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、甘草酸质量分数的 RSD 分别为 1.34%、2.35%、2.55%、2.67%、1.82%、2.45%、1.16%、1.46%、0.48%、2.20%、1.37%、2.63%, 表明该方法的重复性良好。

2.3.8 加样回收率考察 取已测知指标性成分含量的 S1 基准煎液基准煎液共 6 份, 分别加入与供试品溶液中相应成分含量约 1:1 的对照品溶液, 按照“2.2.3”项下方法平行制备, 按照“2.2.1”项下色谱条件进样分析, 计算加样回收率, 结果腺苷、梓醇、苦杏仁苷、羟基红花黄色素 A、芍药苷、阿魏酸、甘草苷、芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、甘草酸的平均加样回收率分别为 98.93%、98.79%、100.72%、101.92%、100.68%、99.12%、96.87%、97.17%、103.27%、98.96%、103.43%、96.94%, RSD 分别为 2.74%、1.71%、1.22%、2.39%、2.58%、2.66%、1.49%、1.36%、1.66%、1.59%、2.13%、1.95%, 表明该方法准确度良好。

2.4 BBD-RSM 试验设计优化 XZD 提取工艺

2.4.1 关键质量属性 (critical quality attributes, CQAs) 和 CPPs 的确定 结合 XZD 的临床应用及实践可操作性, 选取以下指标确保 XZD 的制备工艺符合标准, 以 12 个指标性成分腺苷、梓醇、苦杏仁苷、羟基红花黄色素 A、芍药苷、阿魏酸、甘草苷、芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、甘草酸含量 ($Y_1\sim Y_{12}$)、出膏率 (Y_{13})、指纹图谱相似度 (Y_{14}) 为 CQAs。根据课题组前期试验和已有文献^[15], 以乙醇体积分数 (X_1)、提取时间 (X_2) 以及

溶剂倍数 (X_3) 为 CPPs。

2.4.2 BBD-RSM 试验设计 采用 Design-Expert V 13.0 软件设计 BBD-RSM 试验 (3 因素 3 水平), 共 17 组 (含 12 个析因点和 5 个中心点)。按照表 1 中

S1 对应的饮片批号, 按照相同处方量分别称取 17 份。根据表 2 相应条件提取并收集提取液, 测定各项指标值。每组平行操作 3 份, 结果取平均值。试验设计因素及结果见表 2。

表 2 提取工艺响应面试验设计及结果

Table 2 Response surface test design and results of extraction process

试验号	X_1 / %	X_2 / h	X_3 / 倍	质量分数/(mg·mL ⁻¹)												Y_{13} / %	Y_{14}	综合 评分
				Y_1	Y_2	Y_3	Y_4	Y_5	Y_6	Y_7	Y_8	Y_9	Y_{10}	Y_{11}	Y_{12}			
1	50 (-1)	1 (-1)	8 (0)	0.602	1.123	1.879	0.316	0.237	0.022	0.039	0.045	0.513	0.015	5.103	0.516	30.41	0.987	0.428
2	70 (+1)	1	8	0.483	0.428	2.284	0.334	0.207	0.030	0.044	0.043	0.671	0.016	4.589	0.393	26.41	0.990	0.449
3	50	3 (+1)	8	0.421	1.948	2.626	0.297	0.204	0.022	0.023	0.037	0.419	0.020	3.282	0.554	34.43	0.994	0.412
4	70	3	8	0.508	0.785	2.800	0.203	0.277	0.026	0.049	0.055	0.538	0.021	4.275	0.488	29.87	0.998	0.458
5	50	2 (0)	6 (-1)	0.151	0.632	1.250	0.402	0.282	0.037	0.034	0.050	0.480	0.013	3.126	0.394	29.48	0.986	0.440
6	70	2	6	0.291	0.657	0.817	0.295	0.254	0.026	0.045	0.047	0.567	0.015	4.794	0.419	25.27	0.995	0.469
7	50	2	10 (+1)	0.701	0.723	2.471	0.295	0.263	0.025	0.042	0.047	0.534	0.016	4.412	0.495	30.29	0.993	0.405
8	70	2	10	0.226	0.631	2.594	0.288	0.260	0.034	0.036	0.050	0.637	0.017	4.272	0.430	27.84	0.996	0.501
9	60 (0)	1	6	0.482	0.981	2.051	0.365	0.158	0.033	0.065	0.056	0.579	0.016	4.822	0.475	30.37	0.990	0.491
10	60	3	6	0.350	1.249	2.701	0.269	0.225	0.023	0.051	0.042	0.389	0.020	2.883	0.446	29.02	0.988	0.458
11	60	1	10	0.473	0.752	1.870	0.348	0.203	0.023	0.067	0.055	0.603	0.024	4.961	0.518	32.15	0.995	0.487
12	60	3	10	0.477	0.855	2.782	0.422	0.255	0.040	0.032	0.046	0.677	0.022	4.953	0.392	32.45	0.997	0.485
13	60	2	8	0.700	0.537	1.258	0.285	0.203	0.027	0.023	0.037	0.509	0.015	3.514	0.405	29.29	0.991	0.329
14	60	2	8	0.568	0.519	1.242	0.262	0.161	0.024	0.027	0.032	0.519	0.014	3.773	0.464	29.88	0.983	0.361
15	60	2	8	0.579	0.518	1.487	0.336	0.153	0.021	0.029	0.033	0.561	0.017	3.909	0.455	31.62	0.996	0.374
16	60	2	8	0.567	0.476	1.206	0.277	0.151	0.022	0.024	0.030	0.405	0.015	3.560	0.407	29.12	0.989	0.339
17	60	2	8	0.575	0.587	1.421	0.289	0.159	0.022	0.028	0.033	0.528	0.016	4.327	0.470	33.29	0.984	0.379
基准煎液				0.275	1.030	2.356	1.612	1.161	0.099	0.193	0.141	0.706	0.121	6.168	0.570	37.07	-	-

2.4.3 出膏率的测定 分别精密量取 XZD 基准煎液/醇提液各 5 mL, 置于干燥至恒定质量的蒸发皿 (记为 M_1) 中, 水浴蒸干, 在 105 °C 干燥至恒定质量, 冷却, 精密称定质量 (M_2), 根据公式 (1) 计算出膏率。

$$\text{出膏率} = (M_2 - M_1) / M_v \quad (1)$$

M 为药材质量, V 为煎液总体积, v 为取样体积

2.5 基准关联度的原理方法

2.5.1 确定评价对象 基准关联度是评价样品与基准样品相似度的关键参数, 可用于评价醇提工艺与基准样品的一致性^[12]。需预先确定评价的指标数目 (n) 和样品数目 (m), 以 BBD-RSM 试验设计的 17 个试验样品与基准样品进行对比。评价体系包含 14 项指标: 12 个指标性成分含量、出膏率及指纹图谱相似度。分别以试验样品的实测值 (X_{ij} , $i=1\sim m$, $j=1\sim n$) 和基准样品的对应指标值 (S_j , $j=1\sim n$) 作为评价对象。

2.5.2 计算相对偏差 (relative deviation, RD_{ij}) 根

据公式 (2) 计算 X_{ij} 相对于 S_j 的 RD_{ij} , 可以对不同试验样品和基准样品间的差异, 进行更加科学全面的分析。

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

RD_{ij} 表示第 i ($i=1, 2, \dots, n$) 个样本在第 j ($j=1, 2, \dots, m$) 指标上与基准样品的偏离程度, 该数值与相似度呈负相关, 值越小, 代表差别越小, 相似度越高, 工艺稳定性越优。结果 (表 3) 表明, 指纹图谱相似度评价中, 试验号 4 与基准样品的化学组成相似度最接近; 而出膏率指标下, 试验号 3 最接近基准样品。这种分项指标的矛盾性结果印证了单一评价的局限性, 故需通过熵权法构建综合评分模型, 实现提取工艺参数的全局优化。

2.5.3 计算基准关联度 (standard relation, SR_{ij}) 在中药复方工艺优化研究中, 单一评价指标易导致最优参数漂移。当 RD_{ij} 因指标差异无法直接计算综合得分时, 本研究引入 SR_{ij} 作为核心评价模型。该模型以基准样品的质量属性为标准值 (S), 通过 BBD-

表3 BBD-RSM 试验设计的 RD_{ij}和 SR_{ij}值
Table 3 RD_{ij} and SR_{ij} values of BBD-RSM test

序号	RD _{ij}													
	Y ₁	Y ₂	Y ₃	Y ₄	Y ₅	Y ₆	Y ₇	Y ₈	Y ₉	Y ₁₀	Y ₁₁	Y ₁₂	Y ₁₃	Y ₁₄
1	1.189	0.090	0.203	0.804	0.796	0.772	0.800	0.685	0.273	0.877	0.173	0.095	0.180	0.013
2	0.755	0.584	0.030	0.793	0.822	0.698	0.772	0.698	0.050	0.868	0.256	0.312	0.288	0.010
3	0.529	0.891	0.115	0.816	0.824	0.779	0.881	0.737	0.407	0.839	0.468	0.028	0.071	0.006
4	0.845	0.238	0.188	0.874	0.761	0.733	0.745	0.610	0.238	0.830	0.307	0.145	0.194	0.002
5	0.451	0.387	0.470	0.751	0.757	0.623	0.825	0.649	0.320	0.891	0.493	0.309	0.205	0.014
6	0.058	0.362	0.653	0.817	0.782	0.736	0.770	0.669	0.196	0.874	0.223	0.266	0.318	0.005
7	1.548	0.298	0.049	0.817	0.774	0.744	0.785	0.667	0.243	0.865	0.285	0.133	0.183	0.007
8	0.178	0.388	0.101	0.821	0.776	0.654	0.813	0.645	0.097	0.860	0.307	0.247	0.249	0.004
9	0.750	0.048	0.130	0.774	0.864	0.664	0.666	0.604	0.180	0.868	0.218	0.168	0.181	0.010
10	0.272	0.212	0.146	0.833	0.806	0.765	0.737	0.703	0.449	0.837	0.533	0.218	0.217	0.012
11	0.719	0.270	0.206	0.784	0.826	0.768	0.654	0.610	0.145	0.804	0.196	0.091	0.133	0.005
12	0.733	0.170	0.181	0.738	0.780	0.599	0.833	0.672	0.040	0.822	0.197	0.313	0.125	0.003
13	1.543	0.479	0.466	0.823	0.825	0.729	0.883	0.736	0.279	0.880	0.430	0.290	0.210	0.009
14	1.063	0.496	0.473	0.837	0.862	0.761	0.863	0.775	0.265	0.888	0.388	0.185	0.194	0.017
15	1.104	0.497	0.369	0.791	0.869	0.786	0.851	0.766	0.205	0.856	0.366	0.203	0.147	0.004
16	1.061	0.538	0.488	0.828	0.870	0.776	0.874	0.789	0.426	0.876	0.423	0.286	0.214	0.011
17	1.089	0.430	0.397	0.821	0.863	0.780	0.856	0.764	0.252	0.869	0.298	0.176	0.102	0.016

序号	SR _{ij}													
	Y ₁	Y ₂	Y ₃	Y ₄	Y ₅	Y ₆	Y ₇	Y ₈	Y ₉	Y ₁₀	Y ₁₁	Y ₁₂	Y ₁₃	Y ₁₄
1	-0.189	0.910	0.797	0.196	0.204	0.228	0.200	0.315	0.727	0.123	0.827	0.905	0.820	0.987
2	0.245	0.416	0.970	0.207	0.178	0.302	0.228	0.302	0.950	0.132	0.744	0.688	0.712	0.990
3	0.471	0.109	0.885	0.184	0.176	0.221	0.119	0.263	0.593	0.161	0.532	0.972	0.929	0.994
4	0.155	0.762	0.812	0.126	0.239	0.267	0.255	0.390	0.762	0.170	0.693	0.855	0.806	0.998
5	0.549	0.613	0.530	0.249	0.243	0.377	0.175	0.351	0.680	0.109	0.507	0.691	0.795	0.986
6	0.942	0.638	0.347	0.183	0.218	0.264	0.230	0.331	0.804	0.126	0.777	0.734	0.682	0.995
7	-0.548	0.702	0.951	0.183	0.226	0.256	0.215	0.333	0.757	0.135	0.715	0.867	0.817	0.993
8	0.822	0.612	0.899	0.179	0.224	0.346	0.187	0.355	0.903	0.140	0.693	0.753	0.751	0.996
9	0.250	0.952	0.870	0.226	0.136	0.336	0.334	0.396	0.820	0.132	0.782	0.832	0.819	0.990
10	0.728	0.788	0.854	0.167	0.194	0.235	0.263	0.297	0.551	0.163	0.467	0.782	0.783	0.988
11	0.281	0.730	0.794	0.216	0.174	0.232	0.346	0.390	0.855	0.196	0.804	0.909	0.867	0.995
12	0.267	0.830	0.819	0.262	0.220	0.401	0.167	0.328	0.960	0.178	0.803	0.687	0.875	0.997
13	-0.543	0.521	0.534	0.177	0.175	0.271	0.117	0.264	0.721	0.120	0.570	0.710	0.790	0.991
14	-0.063	0.504	0.527	0.163	0.138	0.239	0.137	0.225	0.735	0.112	0.612	0.815	0.806	0.983
15	-0.104	0.503	0.631	0.209	0.131	0.214	0.149	0.234	0.795	0.144	0.634	0.797	0.853	0.996
16	-0.061	0.462	0.512	0.172	0.130	0.224	0.126	0.211	0.574	0.124	0.577	0.714	0.786	0.989
17	-0.089	0.570	0.603	0.179	0.137	0.220	0.144	0.236	0.748	0.131	0.702	0.824	0.898	0.984

RSM 试验设计获取样本实测值 (Z), 其数学模型构建如公式 (3), 结果见表 3。

$$SR_{ij} = 1 - RD_{ij} = 1 - |Z_{ij} - S_j| / S_j \quad (3)$$

2.6 熵权-TOPSIS 法分析

2.6.1 数据归一化处理 利用 EWM 软件确定权重系数。通过数据标准化、概率转换、熵值计算等步

骤过程, 最终确定各指标权重值^[16-17]。

根据公式 (3) 计算得到 SR_{ij} 后, 采用公式 (4) 进行指标标准化处理, 根据公式 (5) 计算第 j (j=1, 2, ..., m) 个指标下 i (i=1, 2, ..., n) 个样本值占该指标的比重 (P_{ij})。

$$Y_{ij} = [SR_{ij} - \min(SR_j)] / [\max(SR_j) - \min(SR_j)] + 0.000 1$$

$$(4)$$

$$P_{ij} = Y_{ij} / \sum_{i=1}^m Y_{ij} \quad (5)$$

根据公式(6), 计算各指标 SR_{ij} 信息熵 (H_j), $Y_1 \sim Y_{14}$ 依次为 0.938 6、0.964 7、0.948 8、0.947 9、0.887 1、0.911 3、0.892 1、0.937 0、0.955 8、0.946 2、0.940 8、0.959 5、0.968 8、0.933 7。

$$H_j = -\sum_{i=1}^m P_{ij} \ln P_{ij} / \ln m \quad (6)$$

根据公式(7), 计算各指标 SR_{ij} 权重系数 (W_j), $Y_1 \sim Y_{14}$ 依次为 0.070 8、0.040 7、0.059 0、0.060 0、0.130 1、0.102 2、0.124 3、0.072 6、0.050 9、0.062 0、0.068 2、0.046 7、0.036 0、0.076 4。

$$W_j = (1 - H_j) / (1 - \sum_{j=1}^n H_j) \quad (7)$$

2.6.2 综合评分 根据公式(7)所得 W_j , 可得综合评分计算公式, 见公式(8), 根据此公式计算得 BBD-RSM 试验各组综合评分, 结果见表 2。

$$\text{综合评分} = \sum_{j=1}^n SR_{ij} \times W_j \quad (8)$$

2.6.3 响应面法结果分析 采用 Design Expert 13.0 软件, 对综合评分结果进行二次多元回归拟合分析, 得回归方程: 综合评分 = 0.356 4 + 0.023 9 X_1 - 0.005 4 X_2 + 0.002 6 X_3 + 0.006 3 X_1X_2 + 0.016 6 X_1X_3 + 0.007 8 X_2X_3 + 0.026 7 X_1^2 + 0.053 6 X_2^2 + 0.070 4 X_3^2 , $R^2 = 0.949 1$ 。采用二次多项式回归模型拟合, 方差分析结果见表 4。模型显著性检验 $P < 0.01$ ($F =$

14.49), 而失拟项 $P > 0.05$ ($F = 0.435 2$), 证实该模型具有统计学意义且无显著偏差, 可精准表征工艺参数与综合评分间的关系。根据响应面分析结果(图 4), 进一步通过三维图、等高线图可视化参数交互效应, 其中, 经模型优化预测, XZD 最优提取条件为 60%乙醇, 提取时间 3 h, 溶剂倍数 10 倍。

表 4 BBD-RSM 试验设计方差分析结果

Table 4 Results of variance analysis of BBD-RSM experimental design

误差来源	平方和	自由度	均方	F值	P值	显著性
模型	0.045 8	9	0.005 1	14.490 0	0.001 0	显著
X_1	0.004 6	1	0.004 6	13.030 0	0.008 6	
X_2	0.000 2	1	0.000 2	0.673 6	0.438 9	
X_3	0.000 1	1	0.000 1	0.157 0	0.703 7	
X_1X_2	0.000 2	1	0.000 2	0.453 4	0.522 3	
X_1X_3	0.001 1	1	0.001 1	3.150 0	0.119 3	
X_2X_3	0.000 2	1	0.000 2	0.685 5	0.435 0	
X_1^2	0.003 0	1	0.003 0	8.530 0	0.022 3	
X_2^2	0.012 1	1	0.012 1	34.350 0	0.000 6	
X_3^2	0.020 8	1	0.020 8	59.290 0	0.000 1	
残差	0.002 5	7	0.000 4			
失拟项	0.000 6	3	0.000 2	0.435 2	0.739 9	不显著
纯误差	0.001 9	4	0.000 5			
总离差	0.048 3	16				

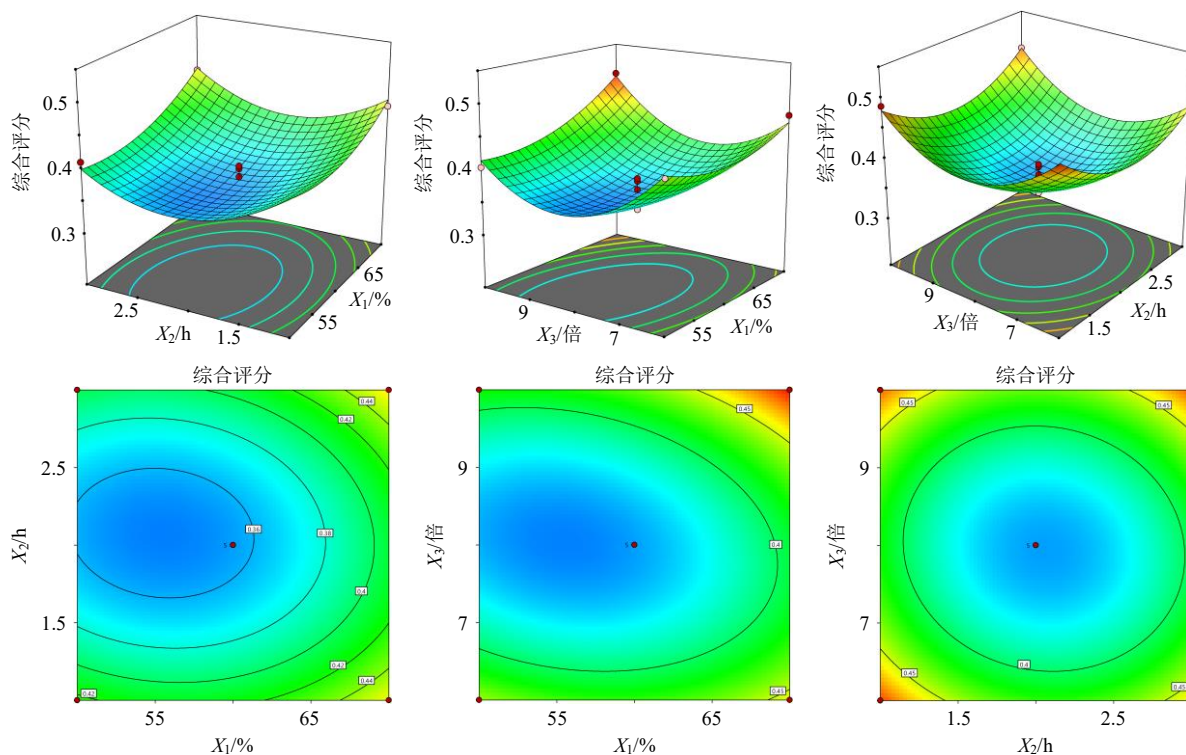


图 4 各因素交互作用对综合评分影响的响应面图及等高线图

Fig. 4 Response surface diagrams and contour maps of interactions of various factors on comprehensive score

2.6.4 TOPSIS 模型建立 根据公式(7)中所得指标权重 W_j , 对经过公式(4)标准化处理后的数据 Y_{ij} 赋予权重^[18], 从而得到决策矩阵(R), 见公式(9)。

$$R = W_j \times Y_{ij} \quad (9)$$

2.6.5 确定正、负理想解 (R^+ 、 R^-) 根据公式(10)和(11)分别计算 SR_{ij} 的 R^+ 、 R^- 。

$$R^+ = (R_1^+, R_2^+, \dots, R_n^+) = \{\max R_{ij} | j=1, 2, \dots, n\} \quad (10)$$

$$R^- = (R_1^-, R_2^-, \dots, R_n^-) = \{\min R_{ij} | j=1, 2, \dots, n\} \quad (11)$$

2.6.6 欧式贴近度 (D) 计算 通过公式(12)和(13)计算 SR_{ij} 到 R^+ 的欧式贴近度 (D_i^+) 和到 R^- 的欧式贴近度 (D_i^-), 结果见表5。

$$D_i^+ = [\sum_{j=1}^n (R_{ij} - R_j^+)^2]^{1/2}, i=1, 2, \dots, n \quad (12)$$

$$D_i^- = [\sum_{j=1}^n (R_{ij} - R_j^-)^2]^{1/2}, i=1, 2, \dots, n \quad (13)$$

2.6.7 计算相对接近度 (S_i) 根据公式(14)计算评价指标 SR_{ij} 与最劣解的 S_i , 结果见表5。 S_i 越大, 表明评价指标越接近最优理想解^[19], 工艺越佳。结果显示试验号12的 S_i 值最大, 对应10倍体积量60%乙醇, 提取3h为最佳工艺, 其质量与基准样品质量最接近, 证实TOPSIS决策模型在复方提取

工艺优化中具有显著稳健性。

$$S_i = D_i^- / (D_i^+ + D_i^-), 0 \leq S_i \leq 1, i=1, 2, \dots, m \quad (14)$$

2.6.8 验证试验 采用最优提取工艺参数连续制备3批XZD样品, 进样测定, 结果见表6。3批样品的综合评分平均值为0.501, RSD为0.75%, 高于目前17组的最高评分, 证实本方法优化确定的提取工艺稳定可靠, 重复性高, 满足中药复方制剂QbD的核心要求。

表5 欧氏贴近度和相对接近度评价结果

Table 5 Results of Euclidean nearness degree and relative proximity evaluation

序号	D_i^+	D_i^-	S_i	排名	序号	D_i^+	D_i^-	S_i	排名
1	0.172	0.170	0.496	11	10	0.171	0.170	0.499	0
2	0.156	0.174	0.528	8	11	0.134	0.221	0.623	4
3	0.214	0.148	0.409	12	12	0.122	0.230	0.653	1
4	0.126	0.218	0.633	2	13	0.227	0.096	0.298	14
5	0.173	0.194	0.528	7	14	0.251	0.071	0.220	16
6	0.170	0.181	0.516	9	15	0.232	0.114	0.330	13
7	0.152	0.193	0.560	6	16	0.261	0.065	0.198	17
8	0.125	0.211	0.629	3	17	0.241	0.093	0.279	15
9	0.152	0.213	0.584	5					

表6 验证试验

Table 6 Results of verification test

序号	质量分数/(mg·mL ⁻¹)												$Y_{13}/\%$	Y_{14}	综合评分
	Y_1	Y_2	Y_3	Y_4	Y_5	Y_6	Y_7	Y_8	Y_9	Y_{10}	Y_{11}	Y_{12}			
1	0.513	0.871	2.761	0.443	0.270	0.043	0.039	0.052	0.667	0.030	5.056	0.426	35.42	0.997	0.500
2	0.498	0.879	2.807	0.422	0.262	0.043	0.040	0.051	0.670	0.030	5.256	0.405	34.27	0.996	0.501
3	0.495	0.887	2.916	0.430	0.264	0.045	0.040	0.050	0.680	0.031	5.086	0.410	33.47	0.995	0.501

2.7 利用 UPLC-Q-OF-MS/MS 技术对 XZD 进行成分表征与对照品验证

前期研究利用基准关联度与熵权-TOPSIS法, 从多指标综合评价角度筛选出了XZD的最优醇提工艺。然而, 仅依靠数学模型优选得到的工艺参数, 尚不足以全面反映其化学本质与基准煎液的物质基础关联。为验证该最佳工艺的化学合理性, 并阐明醇提工艺与基准(水提)工艺在物质基础上的化学异同, 通过UPLC-Q-TOF-MS/MS技术对XZD基准煎液与醇提最优样品进行高分辨质谱分析, 通过全成分定性表征, 结合对照品确证, 明确2种提取工艺下的化学成分差异, 为后续评价醇提工艺与基准煎液的药效一致性提供可靠的化学依据。

2.7.1 色谱、质谱条件 色谱柱为 Kinetex C₁₈ 柱(100 mm×2.1 mm, 2.6 μm); 流动相 A 为 0.01%乙

酸水溶液, 流动相 B 为异丙醇-乙腈(1:1); 梯度洗脱: 0~1.0 min, 1% B; 1.0~8.0 min, 1%~99% B; 8.0~9.0 min, 99% B; 9.0~9.1 min, 99%~1% B; 9.1~12.0 min, 1% B; 进样室温度 4 °C; 体积流量 0.3 mL/min; 进样量 2 μL。

离子源为电喷雾离子源(ESI), 正、负离子模式, 鞘气体积流量 50 arb; 辅助气体体积流量 15 arb; 毛细管温度 320 °C; 全质谱分辨率 60 000; 串联质谱(MS/MS)分辨率 15 000; 碰撞能量(SNCE) 20/30/40 eV; 喷雾电压+3.8 kV 或-3.4 kV。

2.7.2 数据处理 质谱原始数据经 ProteoWizard 软件转为 mzXML 格式, 数据库为 BiotreeDB (V3.0), 使用 R 包进行代谢物鉴定和可视化分析。将所得色谱峰的碎片信息与现有文献、公共数据库(TCM database、TCM Standard、Pubchem 等)及对照品进

行比对, 对各成分进行初步表征。

2.7.3 对照品溶液的制备 同“2.2.2”项下。

2.7.4 供试品溶液的制备 吸取 XZD 基准样品和醇提最优工艺样品, 置于离心管中, 分别于 4 °C、12 000 r/min 离心 15 min (离心半径 6.5 cm), 吸取上清液 300 μ L, 加入 1 000 μ L 提取液 (甲醇-乙腈-水 2 : 2 : 1), 涡旋 30 s, 冰水浴中超声 5 min; 放入 -20 °C 冰箱中静置 1 h; 于 4 °C、12 000 r/min 离心 15 min; 取上层清液, 过 0.22 μ m 微孔滤膜, 即得供试品溶液。

2.7.5 基于数据库匹配的化学成分表征 在正、负离子模式下, 通过保留时间、准分子离子峰、二级离子碎片信息等与数据库进行比对, 共表征出 159 种成分, 包括有机酸类 38 种、萜类 15 种、生物碱 11 种等。这些成分均归属于处方中的 11 味药材, 体现了 XZD 化学成分的多样性及多靶点作用的物质基础。对比醇提最优工艺样品与基准样品的化学轮廓, 除柴胡皂苷 D 在基准样品中未检出外, 其余 158 种成分在 2 种提取方式的样品中均共同存在, 表明醇提工艺在保留绝大多数水提成分的基础上, 增强了脂溶性成分的提取。总离子流图见图 5, 表 7 中展示了其中 40 种主要成分的详细信息。

2.7.6 基于对照品验证的确定性成分鉴定 选取对照品进行比对验证, 通过对比保留时间、质谱碎片及离子模式特征, 确认了表 7 中标“*”的小分子

成分在样品中的存在。该结果表明, 数据库匹配表征结果在关键成分上具有可靠性, 且醇提样品与基准样品的小分子成分检出特征一致, 证实醇提工艺可有效保留基准样品中的小分子物质, 二者的物质基础高度契合。

3 讨论

《中国药典》2025 年版^[20]记载血府逐瘀制剂 (血府逐瘀丸、血府逐瘀胶囊) 等具有行气止痛、活血祛瘀之功效, 主治由气滞血瘀所致胸痹、头痛等症。尽管 XZD 口服疗效确切^[21-22], 但其传统汤剂存在煎煮繁琐、携带不便、口感不佳及胃肠道刺激等局限。吴尚先《理渝骈文》云: “外治之理, 即内治之理; 外治之药, 即内治之药, 所异者法耳。” 中药贴敷疗法可通过透皮吸收直达病所, 具有起效迅速、避免首过效应、减轻胃肠负担等优势, 现已成为 PD 外治常用方法^[23-24]。

课题组前期通过网络药理学与分子对接技术, 阐明 XZD 治疗 PD 的物质基础及作用机制。网络药理学分析结果显示, XZD 活性成分信息前 15 名中的阿魏酸、苦杏仁苷、芍药苷、橙皮苷、甘草苷、新橙皮苷、梓醇、甘草酸、柚皮苷等成分与信号转导与转录激活因子 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)、白细胞介素 -6 (interleukin-6, IL-6) 等气滞血瘀相关靶点的相互作用更为密切, 提示该方改善气滞血瘀状态的作用机制涉及多成分协同靶向不同靶点; 分子对接验证结果进一步表明, STAT3、IL-6 等相关靶点可与新橙皮苷、羟基红花黄色素 A、甘草苷、柚皮苷、苦杏仁苷、阿魏酸 6 种成分实现稳定对接, 上述与靶点结合能力较强的成分, 即为调控气滞血瘀相关病理过程的关键活性成分。这些关键小分子活性成分可靶向 STAT3、IL-6 等核心靶点, 通过调控炎症反应、免疫应答及血管功能等通路, 改善 PD “瘀阻” 病理状态, 为透皮制剂研发奠定了理论基础。其中, 枳壳中的柚皮苷和新橙皮苷是发挥抗炎、抗氧化的重要物质基础^[25]。阿魏酸则具有抗氧化、抗血栓、抗病毒、抗菌等多种生物活性^[26]。基于上述关键活性成分的理化特性, 选取乙醇作为提取溶剂, 既符合 XZD 这些关键活性成分理化性质, 又具有成分富集和杂质削减的优势, 有利于外用剂型开发。

本研究目标为筛选保留传统水提小分子的最优 XZD 醇提工艺, 采用 BBD-RSM 设计开展研究。然而, 传统优化方法难以兼顾成分的全面性与协同性,

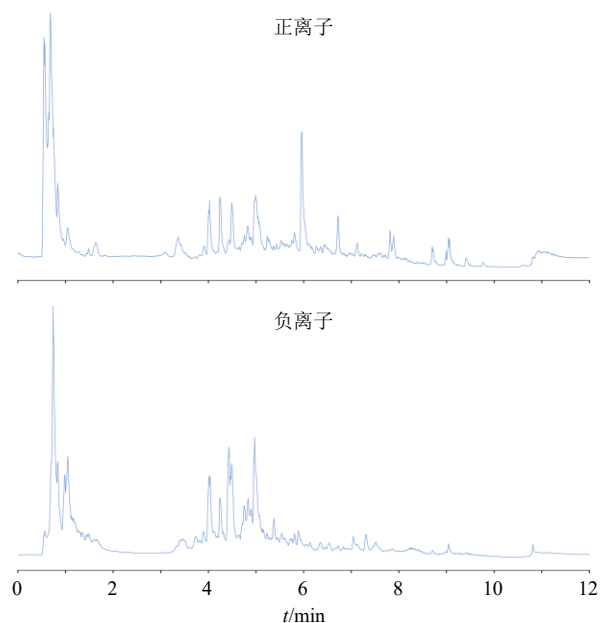


图 5 XZD 的正离子和负离子模式的 TIC 图

Fig. 5 TIC chromatograms of XZD in negative and positive ion modes

表7 XZD中40种主要成分详细信息

Table 7 Detailed information on 40 principal components of XZD

序号	t_R / min	离子模式	化合物名称	分子式	质荷比 (m/z)	偏差 ($\times 10^{-6}$)	碎片离子 (m/z)	化合物类型	药材归属
1	0.76	[M-H ₂ O+H] ⁺	辛弗林	C ₉ H ₁₃ NO ₂	150.091 1	1.5	150.1, 135.1, 119.0	生物碱	枳壳
2	0.86	[M-H] ⁻	梓醇*	C ₁₅ H ₂₂ O ₁₀	361.113 5	1.3	97.0, 169.1, 79.0	萜类	生地黄
3	3.41	[M+H] ⁺	腺苷*	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₄	268.103 9	0.7	136.1, 268.1, 137.1	苷类化合物	当归、红花、桔梗、柴胡
4	3.76	[M+H] ⁺	东莨菪苷	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	355.102 6	0.7	163.0, 146.1, 70.1	香豆素类	当归
5	4.01	[M-H] ⁻	新扁桃苷	C ₂₀ H ₂₇ NO ₁₁	456.150 5	1.4	89.0, 59.0, 101.0	苷类化合物	桃仁
6	4.02	[M-H] ⁻	苦杏仁苷*	C ₂₀ H ₂₇ NO ₁₁	456.150 5	1.4	89.0, 59.0, 101.0	苷类化合物	桃仁
7	4.06	[M+H] ⁺	绿原酸*	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	355.102 0	1.2	163.0, 164.0, 145.0	有机酸类	红花、桃仁
8	4.33	[M-H] ⁻	桂樱苷	C ₁₄ H ₁₇ NO ₆	294.098 3	0.1	71.0, 85.0, 161.0	黄酮类	桃仁
9	4.33	[M-H] ⁻	野黑樱苷	C ₁₄ H ₁₇ NO ₆	294.098 3	0.1	71.0, 85.0, 161.0	黄酮类	桃仁
10	4.41	[M-H] ⁻	咖啡酸	C ₉ H ₈ O ₄	179.034 8	1.1	135.0, 179.0, 136.0	有机酸类	川芎、红花
11	4.43	[M+H] ⁺	羟基红黄色素A*	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₆	613.175 1	2.1	211.0, 313.1, 235.0	黄酮类	红花
12	4.50	[M-H] ⁻	芍药苷*	C ₂₃ H ₂₈ O ₁₁	479.155 3	1.2	121.0, 165.1, 327.1	萜类	赤芍
13	4.66	[M-H] ⁻	毛蕊花苷	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅	623.197 9	0.4	161.0, 623.2, 461.2	黄酮类	生地黄
14	4.84	[M-H ₂ O+H] ⁺	阿魏酸*	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	177.054 3	1.6	177.1, 163.0, 149.1	有机酸类	当归、红花
15	4.94	[M+H] ⁺	橙皮苷*	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₅	611.195 6	2.5	303.1, 85.0, 195.0	黄酮类	枳壳
16	4.96	[M+H] ⁺	芸香柚皮苷*	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₄	581.185 0	2.6	273.1, 85.0, 71.0	黄酮类	枳壳
17	4.96	[M+H] ⁺	柚皮苷*	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₄	581.185 0	2.6	273.1, 85.0, 71.0	黄酮类	甘草、枳壳
18	4.98	[M+H] ⁺	金丝桃苷	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	465.102 7	0.1	303.1, 177.1, 153.0	黄酮类	柴胡、牛膝、甘草
19	4.98	[M+H] ⁺	异槲皮苷	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	465.102 7	0.1	303.1, 177.1, 153.0	黄酮类	红花
20	5.01	[M-H] ⁻	新橙皮苷*	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₅	609.181 5	1.7	301.1, 609.2, 302.1	黄酮类	枳壳
21	5.07	[M+H] ⁺	野漆树苷	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₄	579.169 9	1.6	271.1, 272.1	黄酮类	枳壳
22	5.09	[M+H] ⁺	山柰酚-3-O-芸香糖苷	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	595.164 6	2.0	287.1, 85.0, 288.1	黄酮类	甘草、红花
23	5.28	[M+H] ⁺	芒柄花苷	C ₂₂ H ₂₂ O ₉	431.132 8	2.0	269.1, 270.1	黄酮类	甘草
24	5.55	[M-H] ⁻	黄芩苷	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁	445.077 3	0.7	269.0, 113.0, 85.0	黄酮类	柴胡、赤芍、红花、牛膝
25	5.75	[M+H] ⁺	槲皮素	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	303.049 3	2.1	303.0, 153.0, 177.1	黄酮类	柴胡、甘草、红花
26	5.81	[M+H] ⁺	木犀草素	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	287.054 6	1.6	287.1, 153.0	黄酮类	红花、桔梗、桃仁
27	5.82	[M-H] ⁻	苯甲酰芍药苷	C ₃₀ H ₃₂ O ₁₂	583.182 1	0.1	121.0, 119.1, 165.1	萜类	赤芍
28	5.95	[M-H] ⁻	甘草苷*	C ₂₁ H ₂₂ O ₉	417.118 9	0.6	121.0, 255.1, 193.1	黄酮类	甘草
29	6.09	[M+H] ⁺	花椒毒醇	C ₁₁ H ₆ O ₄	203.033 6	1.5	203.0, 147.0, 175.0	香豆素类	当归
30	6.12	[M-H] ⁻	异芒柄花黄素	C ₁₆ H ₁₂ O ₄	267.066 1	0.4	252.0, 267.1, 253.0	黄酮类	甘草
31	6.33	[M+H] ⁺	桔梗皂苷元	C ₃₀ H ₄₈ O ₇	521.346 8	1.0	455.3, 485.3, 203.1	萜类	桔梗
32	6.79	[M+H] ⁺	丁苯酞	C ₁₂ H ₁₄ O ₂	191.106 4	1.7	145.1, 173.1, 191.1	芳香族化合物	川芎
33	6.81	[M-H] ⁻	洋川芎内酯C	C ₁₂ H ₁₂ O ₃	203.071 3	0.1	203.1, 160.0, 174.0	芳香族化合物	川芎、当归
34	6.95	[M+H] ⁺	柴胡皂苷A	C ₄₂ H ₆₈ O ₁₃	781.472 4	1.2	455.4, 437.3, 419.3	萜类	柴胡
35	6.95	[M+H] ⁺	柴胡皂苷B2	C ₄₂ H ₆₈ O ₁₃	781.472 4	1.2	455.4, 437.3, 419.3	萜类	柴胡
36	7.05	[M+H] ⁺	藁本内酯	C ₁₂ H ₁₄ O ₂	191.106 2	2.4	191.1, 173.1, 145.1	芳香族化合物	柴胡、川芎、当归
37	7.32	[M-H] ⁻	甘草酸*	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₆	821.396 4	0.1	821.4, 351.1, 193.0	萜类	甘草
38	7.52	[M+H] ⁺	柴胡皂苷D	C ₄₂ H ₆₈ O ₁₃	781.472 4	1.2	455.4, 437.3, 253.2	萜类	柴胡
39	7.77	[M+H] ⁺	欧当归内酯A	C ₂₄ H ₂₈ O ₄	381.205 3	2.1	191.1, 192.1, 135.0	芳香族化合物	川芎、当归
40	8.85	[M-H] ⁻	3-表齐墩果酸	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	455.352 8	0.6	455.4, 50.6, 423.1	萜类	牛膝

*经对照品确认。

* confirmed by reference standards.

且无法量化工工艺样品与基准样品的偏离程度,故引入基准关联度实现“多指标优化”与“对标基准”的协同,为小分子保留评价提供量化基础。中药复方工艺优化的难点在于多成分、多指标协同评价,指标权重分配直接影响结果可靠性。传统响应面法采用主观赋权法,易受经验偏差影响,可能忽视阿魏酸、新橙皮苷等关键小分子成分。在此基础上,结合熵权法客观赋权,确定各质量属性的重要性程度;再引入 TOPSIS 模型计算相对接近度,既消除主观偏差保障客观性,又避免单一评分导致的误判。再结合欧氏距离法计算相对距离并排序,可精准区分样品间的细微差异,最终实现最接近基准样品的提取工艺优选。

试验结果显示,醇提样品中羟基红花黄色素 A、芍药苷等极性苷类成分含量低于基准样品,其原因在于该类成分极性高、水溶性更高。但本研究不以单一成分最大化为目标,通过多指标评价体系筛选的醇提工艺,所得 XZD 化合物群具有更好的整体性。Zhang 等^[27]通过 UPLC-Q/TOF MS 技术从 XZD 水提取物中鉴定出 103 种化合物。本研究运用 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术,从醇提和基准样品中共表征 159 种成分,进一步丰富了 XZD 化学成分库,为阐释多靶点药理作用提供了更完整的物质基础。从化学层面上证实,醇提工艺并非对水提工艺的简单替代,而是在高度保留小分子物质基础上,有效减少了大分子惰性物质的溶出量,既继承了传统水提工艺的核心物质基础,也与基准关联度结果相互印证,充分体现了优选醇提工艺的科学性与合理性。

鉴于 XZD 现有质量标准及质量控制方法的不足,本研究基于 QbD 理念,结合基准关联度和熵权-TOPSIS 综合评价法,优化所得的醇提工艺稳健可靠。通过整体表征结合多指标定量质控,并联合 2 种化学计量学方法交叉验证、多角度挖掘指纹图谱信息,证实最优醇提工艺可最大化保留基准样品的物质基础群,且提取更全面,相关结论互为佐证。本研究建立的“整体表征+多指标定量”质控策略,可为阐释 XZD 的药效物质基础、推动经典名方的古今转化提供科学且全面的理论支撑,也为其透皮制剂开发筑牢基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] 傅春燕,刘永辉,曾立,等. 血府逐瘀汤化学成分、药

理作用及临床应用研究进展 [J]. 亚太传统医药, 2024, 20(5): 232-237.

[2] Yi T, Gao P, Hou M, *et al.* The mechanisms underlying the actions of Xuefu Zhuyu Decoction pretreatment against neurological deficits after ischemic stroke in mice: The mediation of glymphatic function by aquaporin-4 and its anchoring proteins [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 1053253.

[3] 李静,郭志华,刘建和,等. 基于代谢组学探讨血府逐瘀汤对冠心病心血瘀阻证模型大鼠的疗效机制 [J]. 中国中药杂志, 2023, 48(20): 5623-5631.

[4] Fu C Y, Wu Q, Zhang Z M, *et al.* UPLC-ESI-IT-TOF-MS metabolomic study of the therapeutic effect of Xuefu Zhuyu Decoction on rats with traumatic brain injury [J]. *J Ethnopharmacol*, 2019, 245: 112149.

[5] Leem J, Jo J, Kwon C Y, *et al.* Herbal medicine (Hyeolbuchukeo-Tang or Xuefu Zhuyu Decoction) for treating primary dysmenorrhea: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials [J]. *Medicine*, 2019, 98(5): e14170.

[6] 侯小红,苗芙蕊,范郁山. 痛经相关病因病机述要 [J]. 江西中医药, 2014, 45(4): 7-8.

[7] Karout S, Soubra L, Rahme D, *et al.* Prevalence, risk factors, and management practices of primary dysmenorrhea among young females [J]. *BMC Women's Health*, 2021, 21(1): 392.

[8] 周爱鲜,廖正根,勒孚仕,等. 基于指纹图谱与多指标成分定量结合化学模式识别分析的小儿热速清颗粒质量评价研究 [J]. 药物分析杂志, 2024, 44(6): 1062-1073.

[9] 代云桃,靳如娜,吴治丽,等. 基于标准汤剂(物质基准)的经典名方制备工艺和质量标准研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(2): 164-174.

[10] 张敏,黄雪艳,曾庆祥,等. 基于基准关联度和 AHP-熵权法的二仙汤醇提工艺研究 [J]. 中国药理学杂志, 2025, 60(8): 801-808.

[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] 郑文烈,张强,冯飞,等. 基于基准关联度和熵权-优劣解距离法综合评价优选经典名方羌活胜湿汤提取工艺 [J]. 中草药, 2024, 55(10): 3310-3320.

[13] 潘龙祥,高喜梅,乔萍,等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术结合化学模式识别分析温胆汤不同工艺的差异性成分 [J]. 中草药, 2025, 56(8): 2811-2828.

[14] 林景,莫俊俏,宋艳,等. 基于网络药理学和实验验证探讨血府逐瘀汤治疗特发性肺纤维化的作用机制 [J]. 中成药, 2024, 46(2): 658-665.

- [15] 马梦鸽, 杨莎, 唐志书, 等. 基于 HPLC 指纹图谱与一测多评法联用的血府逐瘀片质量控制研究 [J]. 中草药, 2021, 52(22): 6856-6863.
- [16] 牛成琳, 殷洪梅, 宋明明, 等. 基于改进 AHP-熵权-关联度及化学计量学的经典名方一贯煎提取工艺研究 [J]. 中草药, 2024, 55(4): 1178-1188.
- [17] 张荣华, 靳梓微, 邱智东, 等. 基于基准关联度和 AHP-熵权法优化经典名方达原饮的提取工艺 [J]. 时珍国医国药, 2024, 35(3): 612-615.
- [18] 何宝峰, 马新换, 徐志伟, 等. 基于改进熵权法联合 TOPSIS 模型和 BPNN 建模优化甘草糖类成分提取工艺 [J]. 中国药学杂志, 2023, 58(8): 675-682.
- [19] 李雨昕, 邢娜, 白浩东, 等. 基于熵权法的灰色关联法-TOPSIS 法对不同产地三七及其炮制品质量的评价研究 [J]. 中草药, 2023, 54(4): 1252-1259.
- [20] 中国药典 [S]. 一部. 2025: 894.
- [21] 柴美伶. 血府逐瘀胶囊对气滞血瘀证原发性痛经子宫动脉血流阻力的影响 [D]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2022.
- [22] 李思彤. 血府逐瘀胶囊治疗气滞血瘀证原发性痛经的临床观察及对子宫动脉血流速度的影响 [D]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2022.
- [23] 齐会英, 许晓英, 薛娟娣, 等. 消肿止痛贴中医贴敷疗法治疗原发性痛经的临床疗效观察 [J]. 中医临床研究, 2022, 14(34): 130-134.
- [24] 李定宣, 王富春. 中医外治法治疗气滞血瘀型痛经研究概况 [J]. 湖北中医杂志, 2022, 44(11): 63-64.
- [25] 杨萍, 黄清杰, 李喜香, 等. 橙皮苷药理作用及机制的研究进展 [J]. 中草药, 2023, 54(21): 7222-7231.
- [26] 堵滢, 郭明鑫, 吴霞, 等. 阿魏属植物化学成分、药理活性研究进展及其质量标志物预测 [J/OL]. 天然产物研究与开发, (2025-05-19) [2026-01-05]. <https://link.cnki.net/urlid/51.1335.Q.20250519.1018.004>.
- [27] Zhang L, Jiang Z Z, Yang J, *et al*. Chemical material basis study of Xuefu Zhuyu Decoction by ultra-performance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry [J]. *J Food Drug Anal*, 2015, 23(4): 811-820.

[责任编辑 郑礼胜]