

基于网络药理学结合设计空间的金银花-连翘药对水提取工艺研究

崔婷, 李美洲, 甘力帆, 林嘉明, 梁丽金, 黄醒鹏, 张志鹏

(广东一方制药有限公司/广东省中药配方颗粒企业重点实验室, 广东 佛山 528244)

摘要:目的 优选金银花-连翘药对水提取工艺。方法 借助网络药理学对金银花-连翘潜在的活性成分进行初步筛选, 再结合《中国药典》2020 年版一部金银花、连翘项下规定的质量标志物及参考文献确定指标性成分, 同时以金银花-连翘药对的出膏率及指标性成分的提取率作为水提取工艺的关键质量属性 (Critical quality attributes, CQAs), 筛选关键工艺参数 (Critical process parameters, CPPs), 通过 Box-Behnken 设计建立数学模型, 考察 CQAs 和 CPPs 之间的交互作用, 构建金银花-连翘水提取工艺的设计空间。结果 筛选出酚酸类、连翘酯苷 A 和连翘苷作为金银花-连翘药对的指标成分, 饮片规格、提取时间、提取加水量为关键工艺参数。基于设计空间确定的最佳水提取工艺参数为: 连翘饮片规格 0.8~1.2 cm, 一煎加 12 倍量水, 提取 30~50 min, 二煎加 10 倍量水, 提取 25~30 min。结论 运用设计空间验证提取工艺所得的实测值与预测值基本一致, 表明建立的方法稳定可靠, 为金银花-连翘药对的工艺开发及质量控制提供思路。

关键词: 金银花-连翘; 网络药理学; 响应面法; 关键工艺参数; 关键质量属性; 设计空间法

中图分类号: R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-0482(2024)01-0047-14

DOI: 10.14148/j.issn.1672-0482.2024.0047

引文格式: 崔婷, 李美洲, 甘力帆, 等. 基于网络药理学结合设计空间的金银花-连翘药对水提取工艺研究[J]. 南京中医药大学学报, 2024, 40(1): 47-60.

Research on Water Extraction Process of *Flos Lonicerae-Fructus Forsythuae* Based on Network Pharmacology and Design Space

CUI Ting, LI Meizhou, GAN Lifan, LIN Jiaming, LIANG Lijin, HUANG Xingpeng, ZHANG Zhipeng

(Guangdong Yifang Pharmaceutical Co. Ltd., Guangdong Provincial Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Formula Granule, Foshan 528244, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To optimize the water extraction process of *Flos Lonicerae-Fructus Forsythuae* and determine the range of water extraction process parameters. **METHODS** The active components were screened by network pharmacology, and the indicator ingredients were determined in combination with the quality markers under the relevant terms of *Chinese Pharmacopoeia* 2020 edition and the literature. Take extraction yield and the extraction rate of the indicative component as the critical quality attributes of the water extraction process to screen critical process parameters. The mathematical model was established by Box-Behnken experimental design to investigate the interaction between CQAs and CPPs and build the design space of the water extraction process of *Flos Lonicerae-Fructus Forsythuae*. **RESULTS** The extraction percentages of phenolic acids, forsythoside A and forsythin were screened as the index components; specifications of medicinal slices, extraction time and water addition were the key process parameters. Based on the establishment and optimization of the design space, the optimum water extraction process was obtained as follows: the medicinal slice of Lian-Qiao was broken into 0.8-1.2 cm, adding 12 times the amount of water in the first and extract for 30-50 min, 10 times the amount of water in the second and extract for 25-30 min. **CONCLUSION** The verification results show that the measured value obtained by using the design space method to optimize the water extraction process is close to the predicted value, indicating that the method is stable and reliable, which can provide ideas for its further process development and quality control for the couple medicines of *Flos Lonicerae-Fructus Forsythuae*.

KEYWORDS: *Flos Lonicerae-Fructus Forsythuae*; network pharmacology; response surface method; critical process parameters; critical quality attributes; design space method

中药药对是经过历代医家反复实践提炼, 符合中医药对七情配伍理论, 临床发挥协同、抑制或新生

功用, 且已形成相对固定形式, 经常配伍使用的两味药物^[1]。金银花、连翘配伍使用, 代表性方剂为吴

收稿日期: 2023-07-20

基金项目: 佛山市应急科技攻关专项(2020001000206)

第一作者: 崔婷, 女, 主管中药师, E-mail: 770214378@qq.com

通信作者: 张志鹏, 男, 副主任中药师, 主要从事中药及中药配方颗粒质量标准研究, E-mail: zhangzp0909@163.com

鞠通《温病条辨》所载的银翘散。金银花味苦性微寒,入肺、心、胃经,具有清热解毒、疏散风热的功效;连翘味苦、微寒,入肺、心、小肠经,具有清热解毒、疏散风热的功效,二者相须为用,既可用于外感温热而解表,又可用于泻里热而解毒^[2]。现代药理研究表明,金银花-连翘药对具有较好的抗病毒、抗菌及解热抗炎作用,且按 1:1 配伍使用,解热作用最明显^[3-5]。网络药理学是一门新兴的学科,是在系统生物学与计算机技术高速发展的背景下发展起来的,通过揭示中药化合物的作用和治疗机制来研究药物、靶点和疾病之间的关系,阐明中药对疾病的作用机制^[6-7]。网络药理学的系统性质与中医的整体观念基本一致,为中药药效物质基础及作用机制研究提供了一种新的思路,在一定程度上反映了中药研究的趋势^[8]。

质量源于设计(Quality by design, QbD)是通过实验设计来评价关键质量属性(Critical quality attributes, CQAs)和关键工艺参数(Critical process parameters, CPPs)之间的关系模型^[9]。QbD 的理念运用于中药制剂的生产,可找出对工艺参数产生影响的物料属性和工艺参数,建立控制策略,为关键物料属性和关键工艺参数建立可接受的范围而不是固定值。徐冰等^[10]提出中药制剂生产工艺中建立设计空间的设想,认为设计空间法建立的设计空间可以使中药生产工艺参数在一定范围内波动,当药品生产工艺参数在设计空间内时则无需申报,可提高药品监管的灵活性,节约人力、物力及财力。本研究借助网络药理学并结合《中国药典》2020 年版及文献报道对金银花-连翘药对活性成分进行筛选得到指标成分群,采用设计空间法优选金银花-连翘药对水提取工艺,以期对金银花-连翘药对的工业化生产提供理论指导与技术支持。

1 材料

1.1 仪器

Waters Arc 型高效液相色谱仪(Waters 公司);XP26 型百万分之一电子天平(Mettler Toledo 公司);实验室 Milli-Q 超纯水系统(默克股份有限公司);JJ2000B 百分之一电子天平(常熟市双杰测试仪器厂);ME203E 千分之一电子天平(Mettler Toledo 公司);ME204E 万分之一电子天平(Mettler Toledo 公司);KQ-500DE 数控超声清洗机(昆山市超声仪器有限公司);DHG-9147A 型电热恒温干燥箱(上海精宏实验设备有限公司)。

1.2 试药

金银花(批号:YM2104006)购自山东中平药业有限公司;连翘(批号:YC2106018)购自哈尔滨福顺堂药材有限公司,经广东一方制药有限公司孙冬梅主任中药师鉴定,金银花为忍冬科植物忍冬 *Lonicera japonica* Thunb. 的干燥花蕾,连翘为木犀科植物连翘 *Forsythia suspensa* (Thunb.) Vahl 的干燥果实,且为青翘。新绿原酸(批号:DSTD001503,纯度:99.58%)、隐绿原酸(批号:DST210427-035,纯度:98.24%)对照品均购自成都德思特生物技术有限公司;绿原酸(批号:110753-202018,纯度:96.1%)、咖啡酸(批号:110885-201703,纯度:99.7%)、4,5-二-O-咖啡酰奎宁酸(批号:111894-202104,纯度:95.1%)、连翘苷(批号:110821-202117,纯度:94.9%)、连翘酯苷 A(批号:111810-201707,纯度:97.2%)对照品均购自中国食品药品检定研究院;甲醇(分析纯,西陇科学股份有限公司);乙醇(色谱纯,默克股份有限公司);磷酸(色谱纯,天津市科密欧化学试剂有限公司);水为超纯水(实验室 Milli-Q 超纯水系统,默克股份有限公司)。

2 方法与结果

2.1 金银花-连翘药对网络药理学研究

2.1.1 金银花-连翘药对活性成分收集与筛选
利用中药系统药理学数据库与分析平台(Traditional Chinese medicine systems pharmacology database and analysis platform, TCMSP),通过设定口服生物利用度(Oral bioavailability, OB $\geq$ 30%)和类药性(Drug-likeness, DL $\geq$ 0.18)阈值来筛选金银花、连翘的活性成分,同时为避免将金银花、连翘潜在抗病毒的有效成分筛除,还参考金银花、连翘在《中国药典》(2020 年版)中规定的质量标志物及文献调研等,对有明确药理活性的成分进行整理、分析,从而得到金银花-连翘药对主要活性成分集^[11-14],成分合集见表 1。

2.1.2 活性化合物靶标蛋白、疾病基因靶点的筛选及韦恩图构建
利用 TCMSP 数据库中的靶点预测功能收集金银花-连翘药对活性成分的靶标蛋白,借助 UniProt 数据库,导入蛋白名称及设定物种为人,将检索得到的蛋白靶标校正为 UniProt ID 并得到靶标蛋白对应的基因名。以“Respiratory tract infection(RTI,呼吸道感染)”为关键词,分别在 GengCards 数据库、OMIM 数据库进行搜索,合并除去重复值,得到 RTI 相关疾病靶点,根据“Relevance

score”,以中位数法选取得到 2 551 个基因靶点。将

二者共同靶点,则为药对活性成分治疗呼吸道感染的潜在靶点,韦恩图结果见图 1。

上述疾病靶点与成分靶点取交集,构建韦恩图,筛选

表 1 金银花-连翘药对主要活性成分基本信息

Table 1 The key active components of <i>Flos Lonicerae-Fructus Forsythuae</i>					
组分	MOL ID	化合物	Pubchem CID	OB/%	DL/%
金银花	MOL000449	豆甾醇	5280794	43. 83	0. 76
	MOL001494	Mandenol	5282184	42. 00	0. 19
	MOL001495	亚麻酸乙酯	6371716	46. 10	0. 20
	MOL002773	β -叶红素	5280489	37. 18	0. 58
	MOL002914	Eriodictiol(flavanone)	373261	41. 35	0. 24
	MOL003006	(-)-(3 <i>R</i> ,8 <i>S</i> ,9 <i>R</i> ,9 <i>aS</i> ,10 <i>aS</i>)-9-ethenyl-8-(β -D-glucopyranosyloxy)-2,3,9,9 <i>a</i> ,10,10 <i>a</i> -hexahydro-5-oxo-5 <i>H</i> ,8 <i>H</i> -pyrano[4,3- <i>d</i>]oxazolo[3,2- <i>a</i>]pyridine-3-carboxylic acid_qt	/	87. 47	0. 23
	MOL003014	Secologanic dibutylacetal_qt	/	53. 65	0. 29
	MOL003036	ZINC03978781	11870462	43. 83	0. 76
	MOL003044	Chryseriol	5280666	35. 85	0. 27
	MOL003095	5-羟基-7-甲氧基-2-(3,4,5-三甲氧苯基)色酮	10970376	51. 96	0. 41
	MOL003111	Centauroside_qt	/	55. 79	0. 50
	MOL003117	Ioniceracetalides B_qt	/	61. 19	0. 19
	MOL003128	Dinethylsecologanocide	/	48. 46	0. 48
连翘	MOL000173	Wogonin	5281703	30. 68	0. 23
	MOL000211	Mairin	64971	55. 38	0. 78
	MOL000522	牛蒡子苷	100528	69. 67	0. 88
	MOL000791	荷包牡丹碱	10237	81. 25	0. 57
	MOL003283	(2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i>)-4-(4-Hydroxy-3-methoxy-phenyl)-7-methoxy-2,3-dimethylol-tetralin-6-ol	160521	66. 51	0. 39
	MOL003290	(3 <i>R</i> ,4 <i>R</i>)-3,4-Bis[(3,4-dimethoxyphenyl)methyl]oxolan-2-one	384877	52. 30	0. 48
	MOL003295	(+)-松脂酚单甲基醚	/	53. 08	0. 57
	MOL003305	连翘苷	24721571	36. 40	0. 86
	MOL003306	ACon1_001697	21722915	85. 12	0. 57
	MOL003308	(+)-松脂酚单甲基醚-4- <i>D</i> - β -葡萄糖苷	/	61. 20	0. 57
	MOL003315	3Beta-acetyl-20,25-epoxydammarane-24alpha-ol	/	33. 07	0. 79
	MOL003322	连翘酯醇	/	95. 04	0. 57
	MOL003330	(-)-连翘脂素	3083590	42. 06	0. 74
共有及其活性成分	MOL003347	Hyperforin	441298	44. 03	0. 61
	MOL003370	Onjixanthone I	5320290	34. 45	0. 84
	MOL000006	木犀草素	5280445	36. 16	0. 25
	MOL000098	槲皮素	5280343	46. 43	0. 28
	MOL000358	β -谷甾醇	222284	36. 91	0. 75
	MOL000414	咖啡酸	1549111	54. 97	0. 05
	MOL000415	芦丁	5280805	3. 20	0. 68
	MOL000422	山柰酚	5280863	41. 88	0. 24
	MOL003065	隐绿原酸	9798666	10. 48	0. 33
	MOL003066	新绿原酸	5280633	10. 65	0. 33
	MOL003068	4,5-二- <i>O</i> -咖啡酰奎宁酸	6474309	1. 73	0. 69
	MOL003331	连翘酯苷 A	5281773	3. 05	0. 61
	MOL003871	绿原酸	1794427	13. 61	0. 31

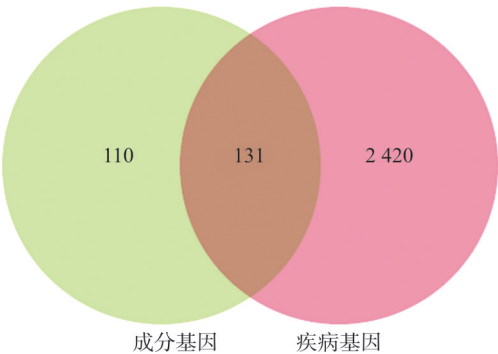


图 1 金银花-连翘药对成分靶点与疾病靶点韦恩图

Fig. 1 Venn diagram of *Flos Lonicerae-Fructus Forsythuae* components genes and disease genes

2.1.3 靶点通路分析 将靶点导入 DAVID 数据库进行基因本体 (Gene ontology, GO) 功能富集分析和京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路富集分析, 以 $P <$

0.05 为筛选条件, 得到 GO 条目 555 个, 其中生物过程 (BP) 条目 439 个, 细胞组成 (CC) 条目 46 个, 分子功能 (MF) 条目 70 个, 分别占 79.1%、8.3%、12.6%。KEGG 通路富集分析筛选得到 144 条信号通路, 分别选 P 值最小的前 20 个富集结果进行可视化分析, 见图 2~3。GO-BP 分析筛选的前 20 条富集结果主要涉及基因表达的正向调控、凋亡过程的负向调控等; GO-CC 分析筛选前 20 条富集结果主要涉及细胞核、细胞质等; GO-MF 分析筛选前 20 条富集结果主要涉及肽酶活性、蛋白同源二聚体活性、细胞因子活性等。KEGG 分析筛选前 20 条富集结果涉及 IL-17 信号通路、TNF 信号通路、PI3K-Akt 信号通路等, 主要与病毒感染、炎症反应、机体免疫等相关^[15]。

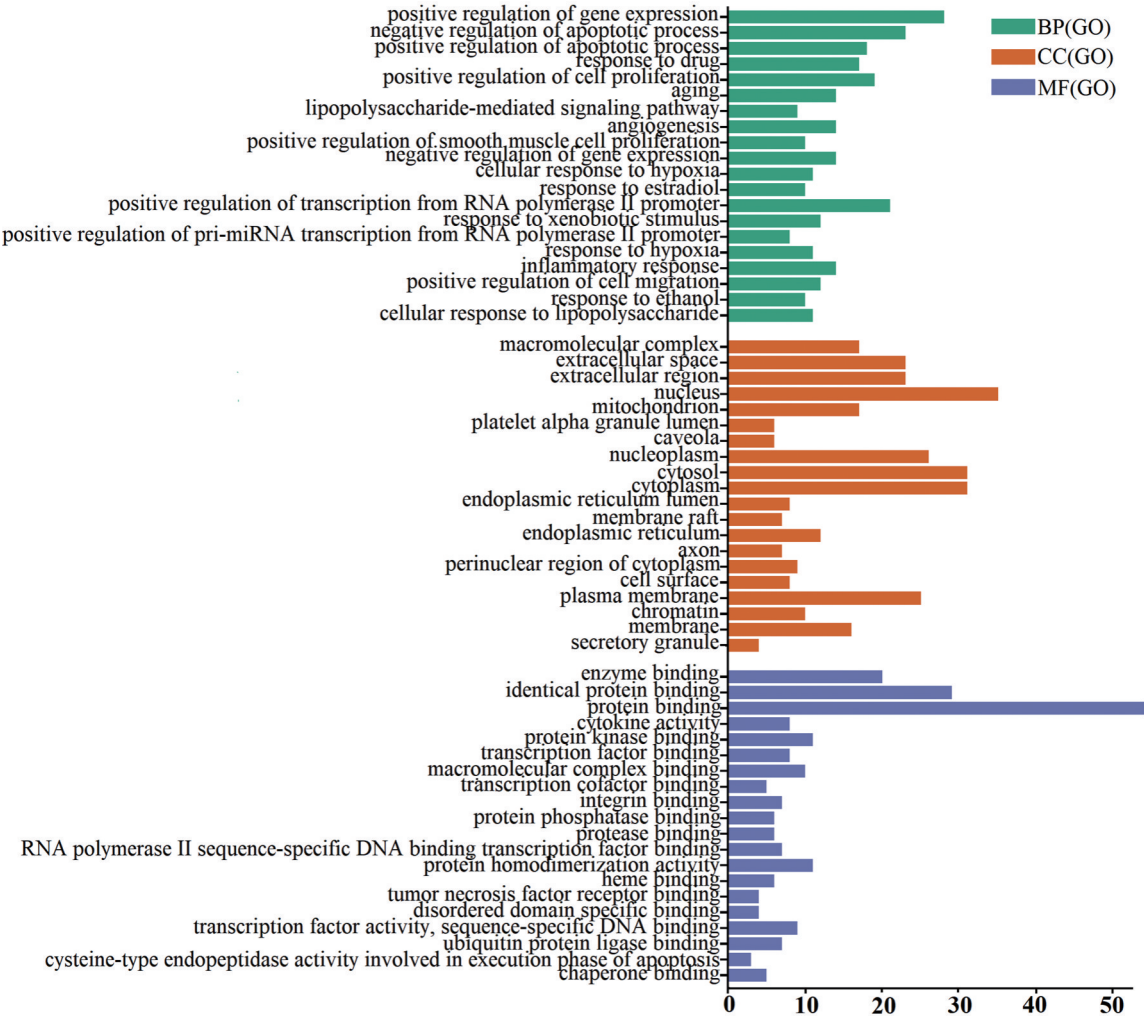


图 2 金银花-连翘药对成分作用靶点 GO 功能分析

Fig. 2 Analysis of GO function of ingredient action targets of *Flos Lonicerae-Fructus Forsythuae*

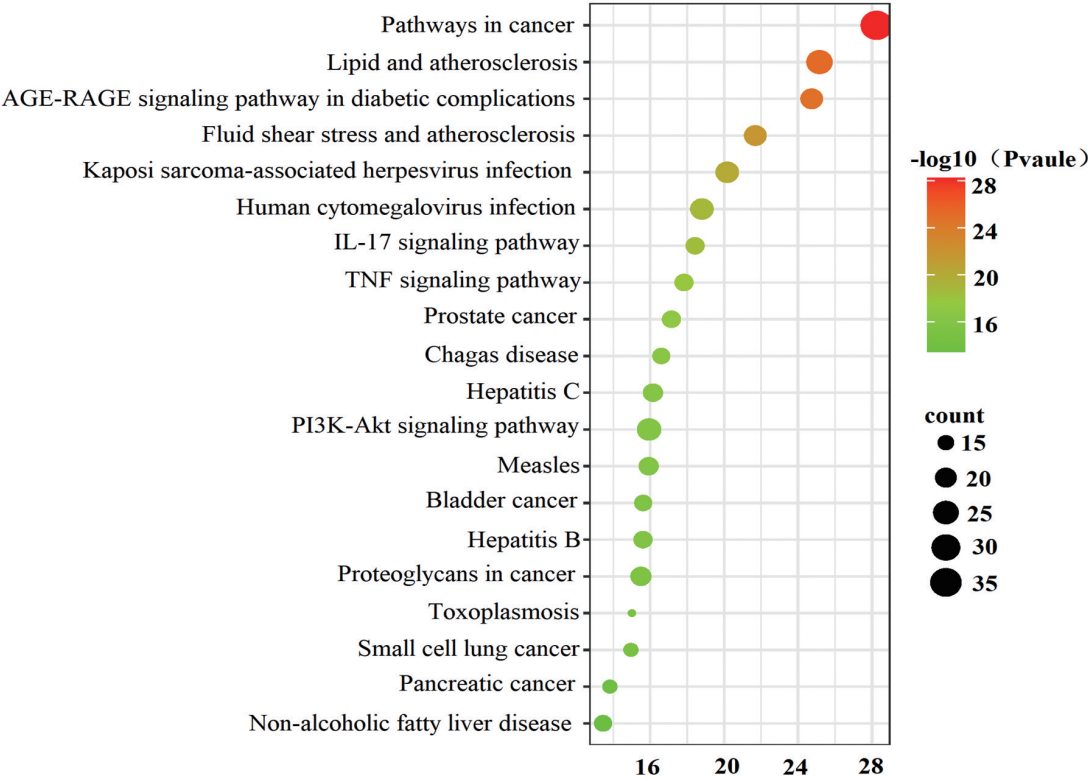


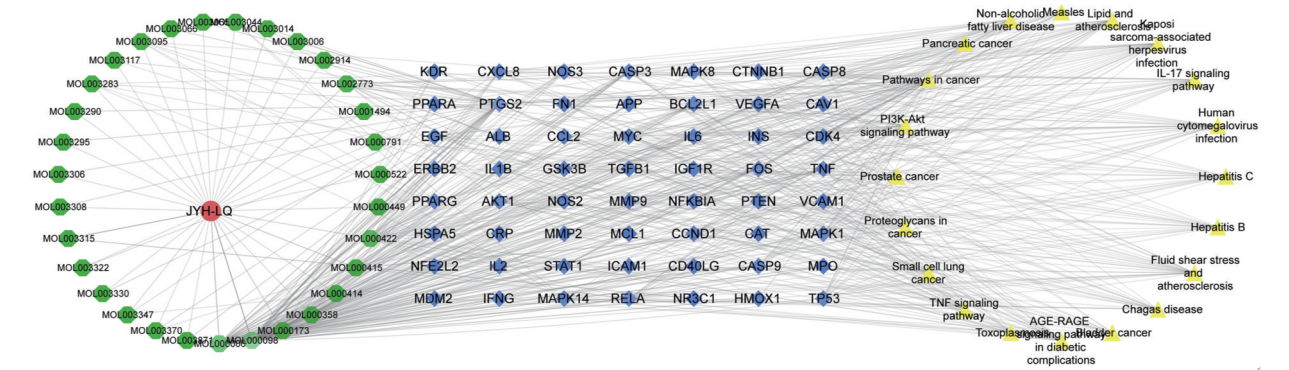
图 3 金银花-连翘药对成分作用靶点 KEGG 通路富集分析的 20 条通路气泡图

Fig. 3 20-Channel bubble diagram of KEGG pathway enrichment analysis of *Flos Lonicerae-Fructus Forsythiae*

2. 1. 4 药物-成分-靶通路相互作用网络图的构建

将得到的交集基因导入 Cytoscape3. 7. 2 软件, 设置“度值 (Degree)、中介值 (Betweenness)、紧密值 (Closeness)” 3 个参数均大于中位数的点作为主要成分和核心靶点, 构建药物-成分-靶点-通路相互作用网络图。该药物-成分-靶点-通路相互作用网络共 108 个节点 (包括 1 个药物、31 个活性成分、56 个靶点、20 条通路) 和 696 条边, 见图 4。根据网络拓扑参数分析可知, 连接化合物或靶点较多的节点在整个网络中起到枢纽作用, 可能是关键的化合物

或靶点, 且存在一个成分连接多个靶点、多种成分作用到同一个靶点上、一个靶点与多个通路、多个靶点与一个通路相互作用等, 这体现了中药多成分与多靶点、多通路相互作用的整体性与联系性^[16]。基于上述网络拓扑分析活性成分度值排名初步筛选得到的关键化合物、结合文献中有关抗菌抗病毒成分的报道及《中国药典》2020 年版一部中对金银花、连翘药材指标性成分规定和预实验分析结果, 最终确定酚酸类成分、连翘酯苷 A、连翘苷为金银花-连翘药对提取工艺研究质量控制的活性成分群。



注: 红色圆点代表药物; 绿色八边形代表成分; 紫色菱形代表靶点; 黄色三角形代表通路。

图 4 金银花-连翘药对药物-成分-靶点-通路相互作用网络图

Fig. 4 The interaction network diagram of *Flos Lonicerae-Fructus Forsythiae* drug-component-target-pathway

2.2 活性成分群含量测定方法的建立

2.2.1 色谱条件 色谱柱:Agilent Eclipse XDB-C₁₈ 柱(4.6 mm×250 mm,5 μm);流动相:乙腈(A)-0.1%磷酸水溶液(B),梯度洗脱(0~5 min,10%A;5~10 min,10%~15%A;10~30 min,15%~18%A;30~40 min,18%~44%A;40~45 min,44%~10%A);流速:0.8 mL·min⁻¹;检测波长:280 nm;进样量:10 μL;柱温:40 ℃。

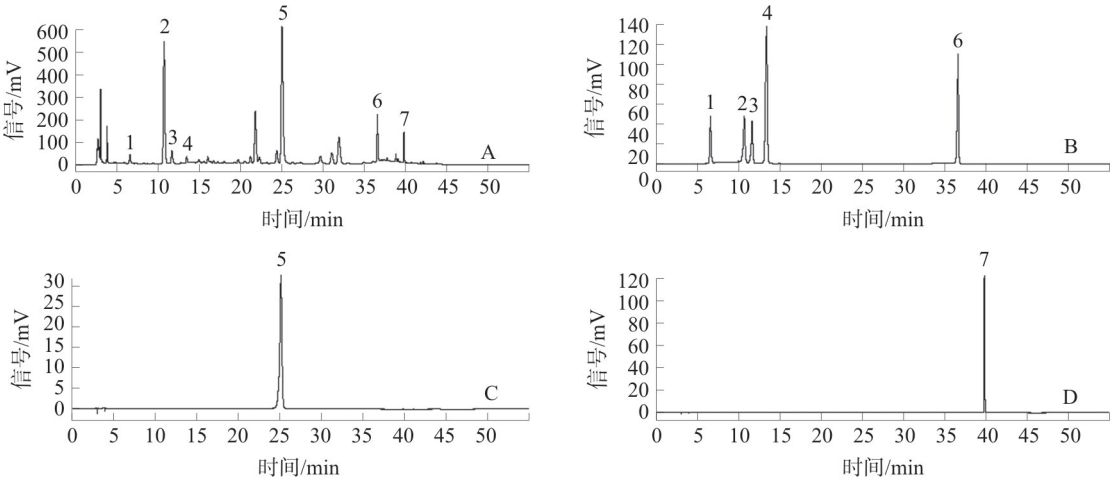
2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取新绿原酸对照品、绿原酸对照品、隐绿原酸对照品、咖啡酸对照品、4,5-二-O-咖啡酰奎宁酸对照品适量,加甲醇制成每 1 mL 含新绿原酸 76.776 2 μg、绿原酸 826.940 5 μg、隐绿原酸 123.727 8 μg、咖啡酸 49.949 7 μg、4,5-二-O-咖啡酰奎宁酸 156.059 1 μg 的混合对照品溶液。另精密称取连翘酯苷 A、连翘苷对照品适量,分别加甲醇制成每 1 mL 含连翘酯苷 A 1 058.584 8 μg、连翘苷 228.424 3 μg 的对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备 取“1.2”项下连翘药

材适量,用装有不同规格筛网的破碎机破碎,得不同规格的连翘饮片。按 1:1 比例称取金银花、连翘饮片适量,加水煎煮 2 次,煎液用 350 目筛网滤过,冷却,精密量取续滤液 10 mL,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 10 mL,称定质量,超声处理(功率 300 W,频率 40 kHz) 30 min,取出,放冷,再称定质量,用 50%甲醇补足损失的质量,摇匀,用 0.22 μm 的微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.2.4 专属性考察 分别精密吸取“2.2.2”项下对照品溶液和“2.2.3”项下供试品溶液,按“2.2.1”项下色谱条件测定。结果表明,供试品溶液中各组分的色谱峰分离良好,且 7 个指标成分的色谱峰均能与对照品参照物峰的保留时间相对应,见图 5。

2.2.5 线性关系考察 分别精密吸取“2.2.2”项下对照品溶液,用甲醇稀释成不同质量浓度的系列混合对照品溶液,按“2.2.1”项下色谱条件进行测定,以对照品溶液浓度(X)为横坐标,峰面积(Y)为纵坐标,绘制标准曲线,得线性回归方程,结果见表 2。



注:A.金银花-连翘药对供试品溶液特征图谱;B~D.对照品特征图谱;1.新绿原酸;2.绿原酸;3.隐绿原酸;4.咖啡酸;5.连翘酯苷 A;6.4,5-二-O-咖啡酰奎宁酸;7.连翘苷

图 5 供试品和对照品 HPLC 图

Fig. 5 HPLC of test substance and reference substances

表 2 各成分线性关系考察

Table 2 Linear relationship investigation of components

组分	回归方程	相关系数(r)	线性范围/(μg·mL ⁻¹)
新绿原酸	Y=10 524X-2 950.7	0.999 9	3.071~76.776
绿原酸	Y=13 228X-25 814	0.999 9	33.078~826.941
隐绿原酸	Y=11 080X-5 034.8	0.999 9	4.949~123.728
咖啡酸	Y=40 485X-3 206.6	0.999 9	1.998~49.950
连翘酯苷 A	Y=9 441.8X+32 643	0.999 9	42.343~1 058.585
4,5-二-O-咖啡酰奎宁酸	Y=25 225X-4 685.5	0.999 9	6.242~156.059
连翘苷	Y=8 074.6X+12 605	0.999 9	9.137~228.424

2.2.6 精密度试验 取“2.2.3”项下供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件连续进样6次,记录新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、连翘酯苷A、4,5-二-O-咖啡酰奎宁酸、连翘苷的峰面积,计算各峰面积RSD值分别为0.70%、0.43%、0.43%、1.10%、0.34%、0.59%、0.43%,表明仪器精密度良好。

2.2.7 稳定性试验 取“2.2.3”项下供试品溶液,按“2.2.1”项下色谱条件,分别在0、2、4、8、12、16、24 h进样,记录新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、连翘酯苷A、4,5-二-O-咖啡酰奎宁酸、连翘苷的峰面积,计算各峰面积RSD值分别为3.03%、2.77%、2.97%、4.51%、3.27%、2.97%、3.22%,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“2.2.3”项下供试品6份,按“2.3.2”项下方法制备供试品溶液,并按“2.2.1”项下色谱条件进行测定,记录新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、连翘酯苷A、4,5-二-O-咖啡酰奎宁酸、连翘苷的峰面积,计算其含量并计算RSD值分别为0.35%、0.66%、0.78%、0.68%、1.07%、1.91%、0.55%,说明该方法重复性良好。

2.2.9 加样回收率试验 称取已知含量的金银花-连翘药对干浸膏粉6份,每份约0.1 g,精密称定,按供试品中指标成分量与加入对照品量之比1:1原则,分别加入适量的对照品溶液,按“2.3.2”项下方法制备供试品溶液,并按“2.2.1”项下色谱条件进行测定,测定供试品中新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、连翘酯苷A、4,5-二-O-咖啡酰奎宁酸、连翘苷的含量,计算平均回收率分别为:101.15%、93.33%、92.16%、106.04%、99.16%、102.85%、101.60%,RSD值分别为1.34%、1.15%、0.95%、0.32%、0.91%、2.76%、1.47%,表明该方法回收率良好。

2.2.10 样品测定及提取率计算 将“2.2.3”项下制备的供试品溶液按“2.2.1”项下色谱条件进行测定,并参照文献的方法计算提取率^[8]。提取率=各指标成分质量/总投药量×100%。

2.3 出膏率测定

精密吸取金银花-连翘药对提取液25 mL,置于已恒定质量的蒸发皿中,在水浴上蒸干后,于105℃干燥3 h,置干燥器中冷却30 min,迅速精密称定质量,计算出膏率。

$$\text{出膏率} = mV / 25M \times 100\%$$

m 表示25 mL提取液的干浸膏质量, V 表示提

取液总体积, M 表示提取药材质量。

2.4 CQAs和CPPs的确定

2.4.1 CQAs的确定 结合金银花、连翘单味药及金银花-连翘药对临床药理活性的研究,将出膏率、酚酸类成分提取率(新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、4,5-二-O-咖啡酰奎宁酸提取率总和)、连翘酯苷A提取率、连翘苷提取率作为金银花-连翘药对提取工艺的CQAs。

2.4.2 CPPs的筛选 采用鱼骨图对关键工艺参数进行初步筛选,见下图6。根据前期实验研究,可初步判饮片规格、提取时间、提取加水量为影响提取的关键因素。

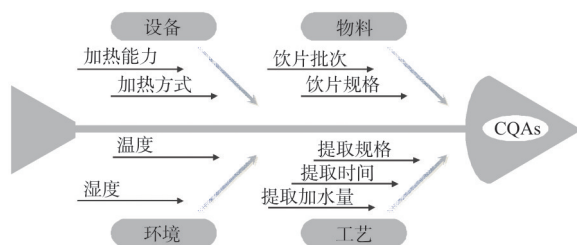


图6 金银花-连翘药对水提取工艺筛选鱼骨图

Fig. 6 Fishbone diagram for water extraction process parameters of *Flos Lonicerae-Fructus Forsythiae*

2.4.3 单因素试验 取“1.2”项下两味中药饮片(1:1)适量,固定提取时间,连翘规格为整个、破碎1.5 cm、破碎1.0 cm、破碎0.8 cm、破碎0.5 cm进行不同饮片规格单因素考察。固定加水量,提取时间分别为一煎20 min、二煎15 min,一煎30 min、二煎30 min,一煎60 min、二煎30 min,一煎60 min、二煎60 min,进行提取时间单因素考察,结果见表3~4。结果表明,随着饮片规格的减小,出膏率先增加后基本不变,指标成分提取率先增加后降低;随着提取时间的延长,出膏率、指标成分提取率增加缓慢。结合金银花和连翘药物性质、酚酸类成分的热敏性质及生产实际情况,确定金银花-连翘药对提取工艺考察最小规格为0.8 cm,最长提取时间为一煎60 min、二煎30 min,并参考《中药配方颗粒质量控制与标准制定技术要求》中有关加水量的说明,确定最大加水倍数为一煎加12倍量水,二煎加10倍量水。

2.4.4 CQAs和CPPs的确定 基于以上单因素试验分析,以出膏率(Y_1)、酚酸类成分提取率(Y_2)、连翘酯苷A提取率(Y_3)、连翘苷提取率(Y_4)作为水提取工艺考察的CQAs,提取规格(X_1)、提取时间(X_2)、提取加水倍数(X_3)作为水提取工艺考察的

CPPs。

表 3 单因素提取规格考察

Table 3 Single factor extraction specification investigation				
提取规格/cm	提取率/%			出膏率/%
	酚酸类成分	连翘酯苷 A	连翘苷	
整个	2.14	1.52	0.10	26.61
1.5	1.93	2.71	0.16	29.93
1.0	2.09	3.50	0.20	31.70
0.8	1.96	3.98	0.24	32.46
0.5	1.95	3.30	0.15	32.46

表 4 单因素提取时间考察

Table 4 Single factor extraction time investigation				
提取时间/min	提取率/%			出膏率/%
	酚酸类成分	连翘酯苷 A	连翘苷	
20+15	2.27	3.37	0.23	33.13
30+30	2.33	3.34	0.23	34.02
60+30	2.47	3.38	0.26	35.29
60+60	2.51	3.38	0.27	35.86

注:30+30 表示一煎煎煮 30 min,二煎煎煮 30 min。

2.5 Box-Behnken 试验

2.5.1 Box-Behnken 试验设计 利用 Design-Expert 11 软件进行三因素三水平的 17 次试验,其中中心点重复 5 次,试验设计见表 5。

表 5 Box-Behnken 实验工艺参数及水平设计与结果

Table 5 Process parameters and levels design and results of Box-Behnken experiments

试验号	因素			响应值			
	X_1 /cm	X_2 /min	X_3	Y_1 /%	Y_2 /%	Y_3 /%	Y_4 /%
1	1.0	60+30	12+10	35.63	2.45	3.34	0.28
2	1.5	30+30	10+8	32.31	2.32	3.03	0.21
3	1.0	60+30	10+8	33.62	2.13	3.03	0.23
4	1.0	30+30	11+9	33.81	2.34	3.42	0.25
5	0.8	20+15	11+9	33.07	2.23	3.54	0.24
6	1.5	60+30	11+9	34.59	2.41	3.11	0.26
7	1.0	30+30	11+9	34.20	2.30	3.36	0.24
8	1.0	20+15	12+10	33.92	2.32	3.50	0.24
9	0.8	30+30	10+8	33.51	2.29	3.57	0.24
10	1.0	30+30	11+9	34.48	2.26	3.29	0.24
11	1.0	20+15	10+8	32.21	2.24	3.17	0.22
12	1.0	30+30	11+9	34.18	2.31	3.33	0.24
13	1.5	30+30	12+10	33.50	2.35	3.17	0.24
14	1.0	30+30	11+9	34.17	2.29	3.30	0.24
15	0.8	60+30	11+9	34.81	2.29	3.32	0.28
16	0.8	30+30	12+10	34.57	2.39	3.62	0.26
17	1.5	20+15	11+9	32.32	2.26	2.90	0.20

注:60+30 表示一煎煎煮 60 min,二煎煎煮 30 min;12+10 表示一煎加 12 倍量水,二煎加 10 倍量水。

2.5.2 模型的建立与评价 采用二阶多项式模型对 4 个 CQAs(Y_1 、 Y_2 、 Y_3 、 Y_4)及相应的 CPP(X_1 、 X_2 、 X_3)进行拟合,建立回归方程如下: $Y_1 = 34.17 - 0.405 0X_1 + 0.891 3X_2 + 0.764 3X_3 + 0.132 5X_1X_2 + 0.032 5X_1X_3 + 0.075 0X_2X_3 - 0.421 5X_1^2 - 0.049 0X_2^2 - 0.274 0X_3^2$; $Y_2 = 2.30 + 0.017 5X_1 + 0.053 8X_2 + 0.041 3X_3 + 0.022 5X_1X_2 - 0.017 5X_1X_3 + 0.010 0X_2X_3 + 0.000 0X_1^2 - 0.002 5X_2^2 + 0.037 5X_3^2$;

$Y_3 = 3.34 - 0.230 0X_1 - 0.038 7X_2 + 0.103 8X_3 + 0.107 5X_1X_2 + 0.022 5X_1X_3 - 0.005 0X_2X_3 - 0.017 5X_1^2 - 0.105 0X_2^2 + 0.025 0X_3^2$; $Y_4 = 0.242 0 - 0.013 8X_1 + 0.018 7X_2 + 0.015 0X_3 + 0.005 0X_1X_2 + 0.002 5X_1X_3 + 0.007 5X_2X_3 - 0.001 0X_1^2 + 0.004 0X_2^2 - 0.003 5X_3^2$ 。

二阶多项式拟合方程相关系数 R^2 分别为 0.943 1、0.871 0、0.926 3、0.935 4,调整 R^2 分别为

0.869 9、0.705 0、0.831 6、0.852 4。方程的拟合相关系数 R^2 均大于 0.87,表明该模型能解释大部分响应值的变化,调整相关系数 R^2 均大于 0.70,表明

回归模型拟合度较好,可以用该模型进行分析。
2.5.3 方差分析 采用 Design-Expert 11 软件对试验结果进行方差分析,方差分析结果见表 6。

表 6 回归模型方差分析结果

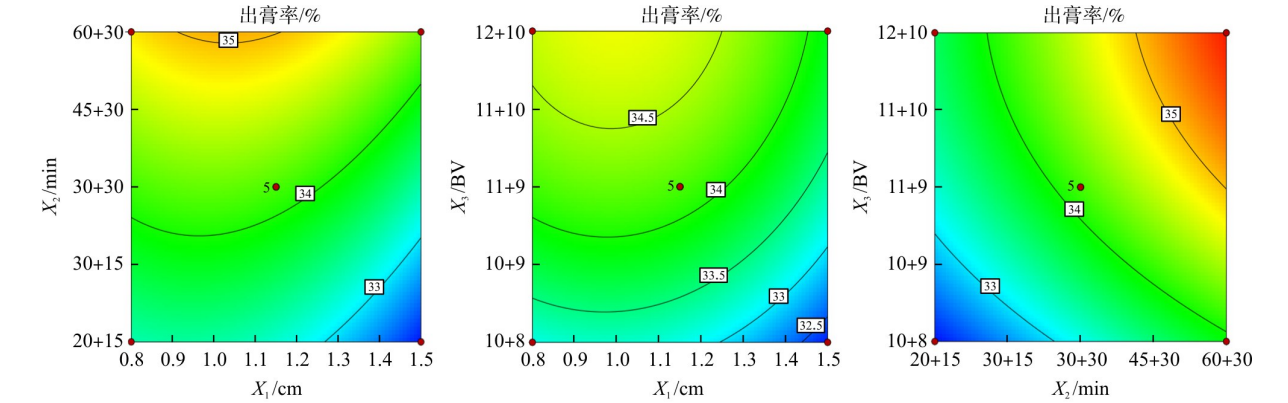
Table 6 ANOVA results of regression model

来源	Y_1		Y_2		Y_3		Y_4	
	F	P	F	P	F	P	F	P
模型	12.88	0.001 4	5.25	0.019 9	9.78	0.003 3	11.27	0.002 1
X_1	11.38	0.011 9	2.37	0.167 3	60.12	0.000 1	23.27	0.001 9
X_2	55.12	0.000 1	22.39	0.002 1	1.71	0.232 7	42.37	0.000 3
X_3	38.64	0.000 4	13.19	0.008 4	12.23	0.010 0	27.69	0.001 2
X_1X_2	0.61	0.460 7	1.96	0.204 0	6.57	0.037 4	1.54	0.254 8
X_1X_3	0.04	0.853 6	1.19	0.312 0	0.29	0.608 3	0.39	0.554 8
X_2X_3	0.19	0.672 0	0.39	0.553 3	0.01	0.908 5	3.46	0.105 1
X_1^2	6.49	0.038 3	0.00	1.000 0	0.18	0.681 5	0.06	0.806 4
X_2^2	0.09	0.775 7	0.02	0.877 6	6.59	0.037 1	1.04	0.342 5
X_3^2	2.74	0.141 7	5.74	0.047 8	0.37	0.560 2	0.79	0.402 6
失拟项	3.41	0.133 2	1.50	0.342 9	4.64	0.086 2	6.25	0.054 4

由表 6 可以看出,出膏率、酚酸类成分提取率、连翘酯苷 A 提取率、连翘苷提取率二项式回归模型方差均显著($P<0.05$),失拟项不显著,表明所建模型有统计学意义,各因素与响应值之间可用此模型函数化。 Y_1 、 Y_4 项下 X_1 、 X_2 、 X_3 的 P 值均小于 0.05,表明该三个因素对 Y_1 、 Y_4 均具有显著影响, Y_2 项下仅 X_2 、 X_3 的 P 值小于 0.05,表明 X_1 对 Y_2 无影响,三个因素影响程度排序为 $X_2>X_3>X_1$, X_1X_2 、 X_1X_3 、 X_2X_3 的 P 值均大于 0.05,表明三个因素的交互作用对 Y_1 、 Y_2 、 Y_4 的影响不显著。 Y_3 项下仅 X_1 、 X_3 的 P 值小于 0.05,表明 X_2 对 Y_3 无影响,三个因素影响程度排序为 $X_1>X_3>X_2$, X_1X_3 、 X_2X_3 的 P 值均大于 0.05,表明因素的交互作用对 Y_3 的影响不显著,

X_1X_2 的 P 值为 0.037 4,小于 0.05,表明 X_1 和 X_2 的交互作用对 Y_3 的影响较大。

2.5.4 响应面分析 用 Design-Expert 11 软件对 Y_1 、 Y_2 、 Y_3 、 Y_4 进行响应面分析,等高线图及响应面图如图 7~10。由图可以直观看出,各因素对 Y_1 、 Y_2 、 Y_4 的影响大小排序为 $X_2>X_3>X_1$,对 Y_3 的影响大小排序为 $X_1>X_3>X_2$,与方差分析结果一致。在规定范围内,水量越大,煎煮时间越短,出膏率和酚酸类成分提取率越高,这与固形物溶出率及酚酸类成分的不稳定性有关;连翘酯苷 A 存在于连翘中,易溶于水,水量越大,连翘规格越小,连翘酯苷 A 越易溶出,提取率则越高。



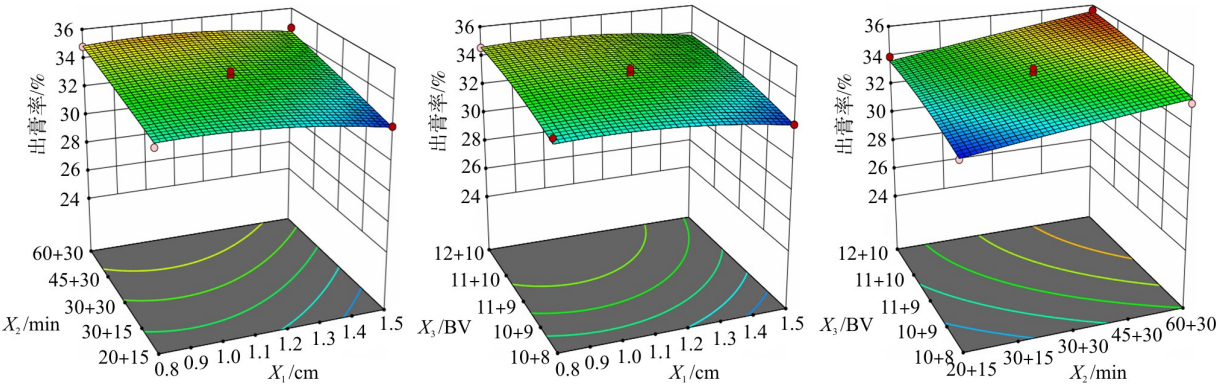


图 7 出膏率的等高线及响应面图

Fig. 7 Contour analysis and response surface figure of content of extract rate

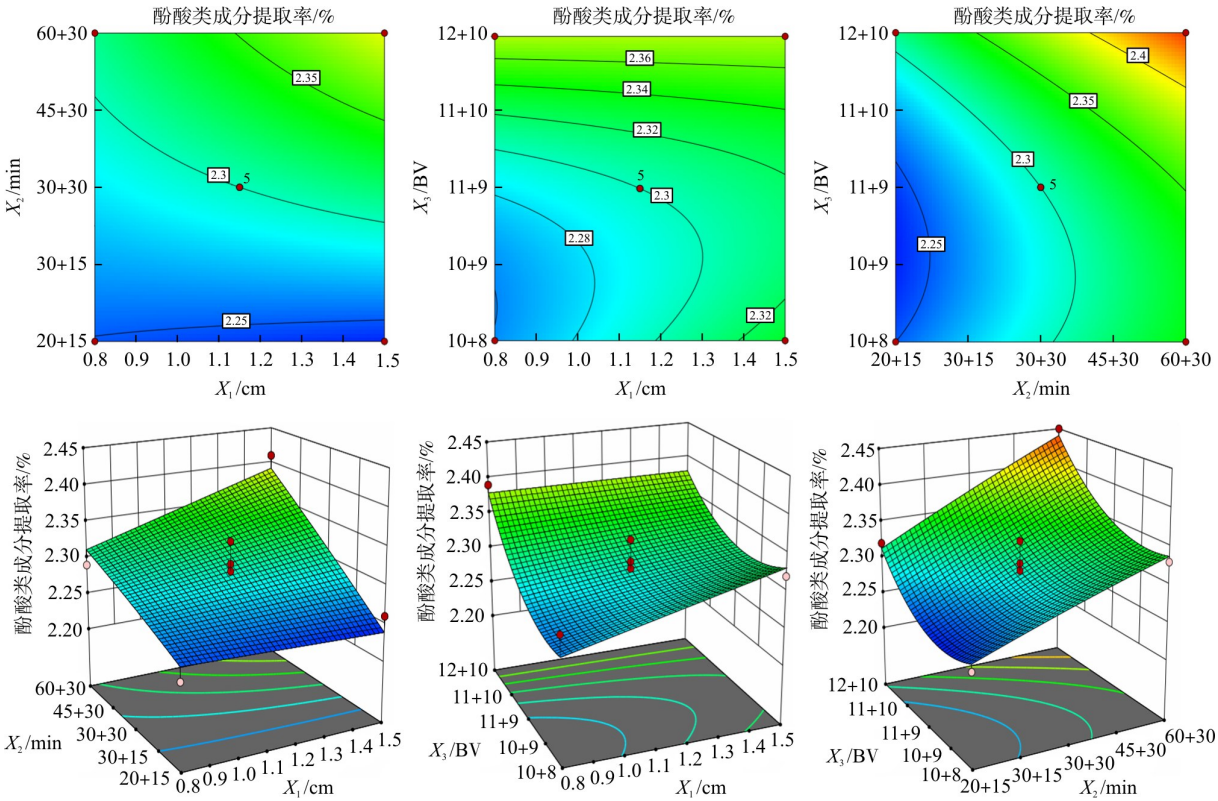
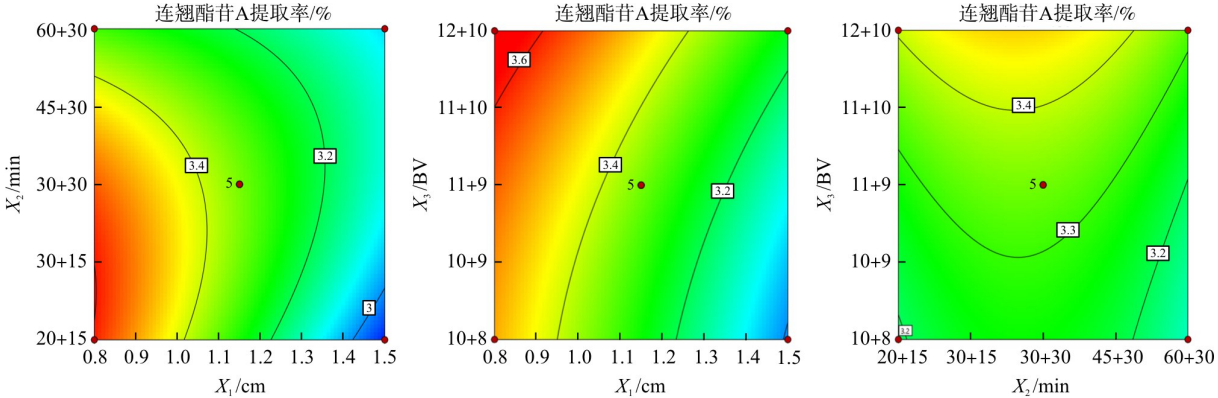


图 8 酚酸类成分提取率的等高线及响应面图

Fig. 8 Contour analysis and response surface figure of the extraction rate of phenolic acids



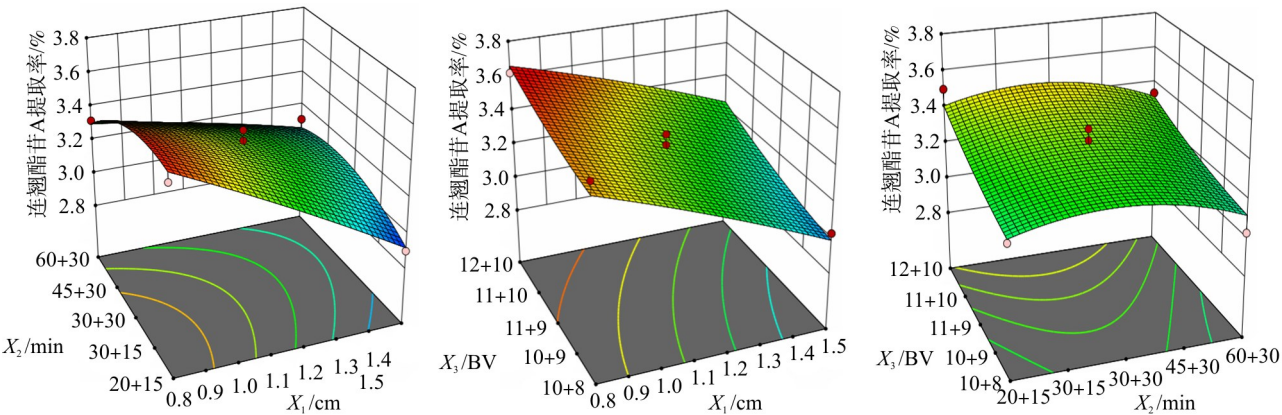


图9 连翘酯苷A提取率的等高线及响应面图

Fig. 9 Contour analysis and response surface figure of the extraction rate of forsythoside A

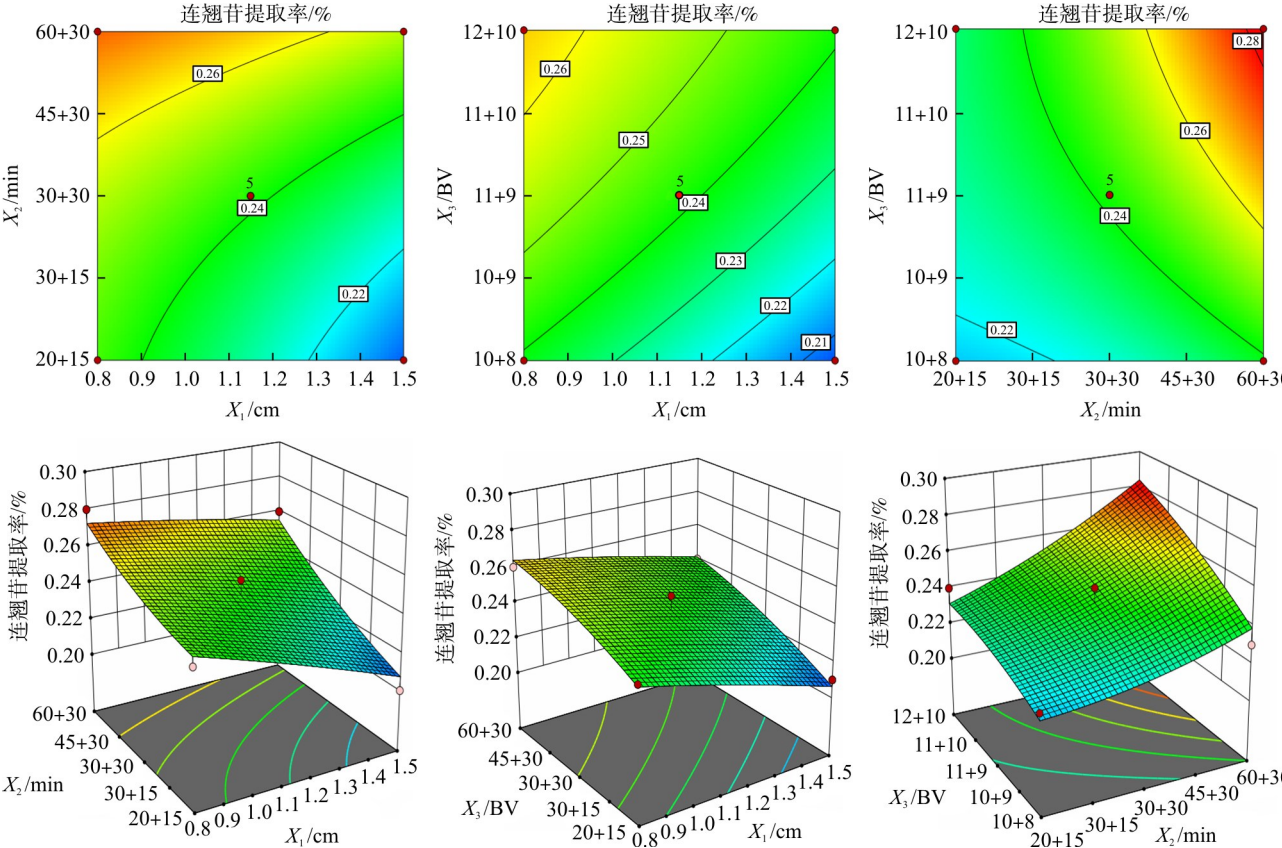


图10 连翘苷提取率的等高线及响应面图

Fig. 10 Contour analysis and response surface figure of the extraction rate of forsyth

运用 Design-Expert 11 软件优化所得金银花-连翘药对最佳水提取工艺为:连翘规格为 0.91 cm、提取加水量为一煎 12 倍量水、二煎 10 倍量水,煎煮时间为一煎 58.92 min、二煎 29.46 min,在此条件下,出膏率为 35.53%、酚酸类成分提取率为 2.43%、连翘酯苷 A 提取率为 3.38%、连翘苷提取率为 0.29%。根据响应面结果及实际生产情况,优化最佳水提取工艺为:连翘规格为 1.0 cm,提取加水量

为一煎 12 倍量水、二煎 10 倍量水,煎煮时间为一煎 60 min、二煎 30 min。

2.6 设计空间的建立

2.6.1 设计空间的建立 生产实践表明,中药制剂所含组分复杂,变异来源较多,实际生产中单一工艺操作模式具有一定的局限性,不能很好地保证产品质量的均一稳定,基于此,通过上述模型预测的最佳提取工艺,在设定的参数空间内寻找满足实验设计

要求的最优化参数区域组合,确定工艺参数范围,即构成设计空间^[17],按此空间内的工艺参数进行生产,可满足实际需要。前期研究表明,该批次金银花-连翘药对基准样品出膏率为 33.92%、酚酸类成分提取率为 2.30%、连翘酯苷 A 提取率为 3.32%、连翘苷提取率为 0.24%,且金银花-连翘药对水提液经浓缩干燥后出膏率及各指标成分含量均有不同程度的损失,参考《中药配方颗粒质量控制与标准制定技术要求》《古代经典名方中药复方制剂基准物质的申报资料要求(征求意见稿)》中有关制剂质量与基准物质质量的一致性要求,在下限 70%的基础上加上成分损失率,确定金银花-连翘药对出膏率大于 33.92%、酚酸类成分提取率大于 2.30%、连翘酯苷 A 提取率大于 3.32%、连翘苷提取率大于

0.24%,以此为条件搜索符合目标的子集,构建设计空间,见图 11(Overlay plot 1)。但模型预测值与真实值存在一定的偏差,所设空间的边界具有不确定性,故在定义设计空间时加入置信水平 $\alpha=0.05$ 的置信区间,对设计空间进行优化,结果见图 11(Overlay plot 2),浅灰色部分即为加入置信区间后矫正的设计空间,在此空间内所有参数组合的预测值基本符合设定目标,深灰色部分为未加入置信水平的不可靠部分,即此空间内的预测值有 5% 概率不满足工艺目标要求。

2.6.2 设计空间的验证 根据图 11 中的设计空间范围,固定提取加水倍量为一煎 12 倍量水、二煎 10 倍量水,选取 3 个点进行设计空间的验证,试验点选取见表 7,试验结果见表 8。

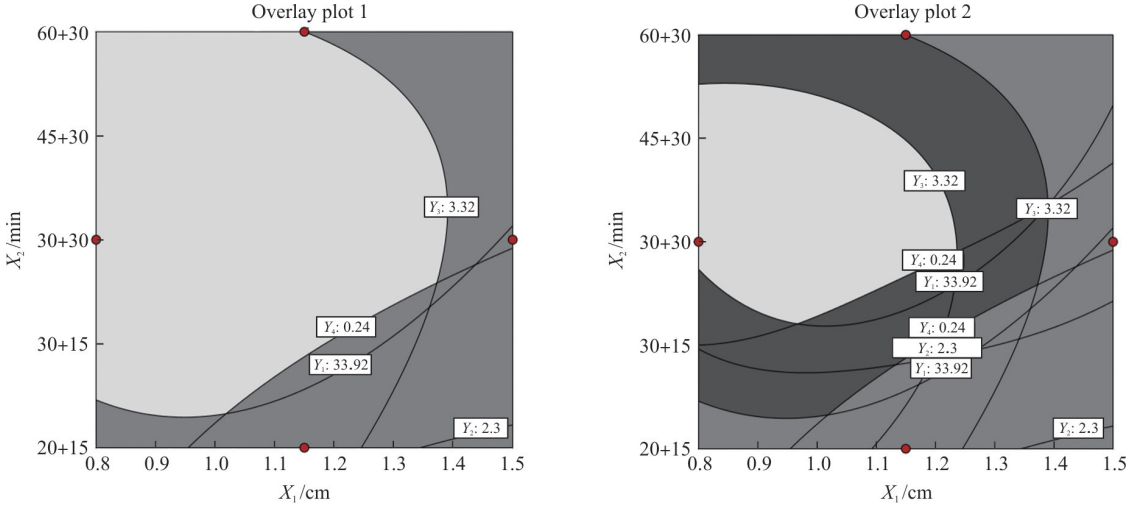


图 11 金银花-连翘药对水提取工艺设计空间

Fig. 11 Design space of water extract process of *Flos Lonicerae-Fructus Forsythuae*

表 7 设计空间验证试验点选取

Table 7 Selection of experimental verification points for design space

序号	X_1/cm	X_2/min	X_3	试验点选取说明
YZ1	1.0	45+30	12+10	Y_1 、 Y_2 、 Y_3 、 Y_4 均在 95% 置信区间内
YZ2	1.2	30+15	12+10	Y_1 、 Y_2 、 Y_3 、 Y_4 部分在 95% 置信区间内,部分在区间外
YZ3	1.5	20+15	12+10	Y_1 、 Y_2 、 Y_3 、 Y_4 均不在 95% 置信区间内

注:45+30 表示一煎煎煮 45 min,二煎煎煮 30 min;12+10 表示一煎加 12 倍量水,二煎加 10 倍量水。

表 8 设计空间验证结果(%)

Table 8 Results of verification test for design space(%)

序号	Y_1		Y_2		Y_3		Y_4	
	预测值	实测值	预测值	实测值	预测值	实测值	预测值	实测值
YZ1	35.12	35.24	2.33	2.37	3.44	3.58	0.27	0.26
YZ2	33.98	34.32	2.26	2.21	3.42	3.63	0.24	0.26
YZ3	33.56	33.13	2.22	2.27	3.08	3.18	0.21	0.23

由验证试验结果可知,YZ1中各项均符合要求,YZ2中 Y_2 未达到预设要求,YZ3均未达到要求,表明由于95%置信区间的加入,设计空间边界的不确定性得到了较好的印证,所得模型是可靠、可应用的。

3 讨论

中药药对是连接单味中药与经典复方的重要纽带,目前多数单味中药或方剂提取工艺研究多采用醇提且进行提取次数考察,与传统汤剂水煎煮2次不符,本文在进行提取工艺研究时,按传统汤剂煎煮模式,直接以水为溶媒煎煮2次,并参考《中药配方颗粒质量控制与标准制定技术要求》《古代经典名方中药复方制剂基准物质的申报资料要求(征求意见稿)》中有关基准物质煎煮工艺的要求结合实际提取工艺制备情况,对饮片规格(连翘)、提取时间、提取加水量进行考察。同时采用网络药理学对金银花、连翘的活性成分进行初步筛选,再结合《中国药典》2020年版金银花、连翘项下有关成分及相关文献检索,最终选取抗菌、抗病毒、抗氧化的酚酸类成分(包括新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、4,5-二-O-咖啡酰奎宁酸)、苯乙醇类成分连翘酯苷A、木脂素类成分连翘苷作为有效化学成分指标,同时出膏率也是评价提取工艺的重要指标,因此选择出膏率、酚酸类成分提取率、连翘酯苷A提取率、连翘苷提取率作为金银花-连翘药对提取工艺考察的评价指标。

本研究基于质量源于设计理念,通过Box-Behnken实验设计研究金银花-连翘药对CPP与CQA的相关性,并建立金银花-连翘药对提取工艺的设计空间,结合实际工业化大生产,确定金银花-连翘药对水提取工艺参数操作空间为:连翘提取饮片规格0.8~1.2 cm,煎煮2次,一煎加12倍量水提取30~50 min,二煎加10倍量水提取25~30 min。经验证,各项结果与预测结果基本一致,大生产中可采用设计空间在原料药材质量发生波动或生产设备、生产条件变化的情况下达到工艺可调的目的,保证产品质量的稳定与一致性,做到安全有效、均一可控。通过设计空间的建立,可以加深对金银花-连翘药对提取工艺的全面理解,大大提升生产效率,保证产品质量。

参考文献:

[1] 张国磊,刘健,洪靖,等.《伤寒杂病论》辨治痹证药对探析[J]. 中医学报,2020,35(2):244-247.

ZHANG G L, LIU J, HONG J, et al. Analysis of drug pairs in differentiation and treatment of Bi symptom in Shang Han za Bing Lun[J]. Acta Chin Med, 2020, 35(2): 244-247.

[2] 吴嘉瑞,金燕萍,王凯欢,等.基于网络药理学的“金银花-连翘”药对作用机制分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2017,23(5):179-183.

WU J R, JIN Y P, WANG K H, et al. Mechanism of *Lonicerae japonicae Flos*-weeping *Forsythia* herbal pair based on network pharmacology[J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2017, 23(5): 179-183.

[3] 张美义,何家靖,杨子峰,等.金翘片体内抗流感病毒作用研究[J]. 广州中医药大学学报,2018,35(1):143-148.

ZHANG M Y, HE J J, YANG Z F, et al. Anti-influenza virus activity of Jin Qiao Tablets *in vivo*[J]. J Guangzhou Univ Tradit Chin Med, 2018, 35(1): 143-148.

[4] 覃黎葵. 银翘散对呼吸道合胞病毒感染小鼠呼吸系统模型的作用研究[D]. 广州: 广州中医药大学,2016.

QIN L K. The study of Yin Qiao San on the mouse model of respiratory diseases infected with respiratory syncytial virus[D]. Guangzhou: Guangzhou University of Chinese Medicine, 2016.

[5] 王冠杰. 银翘抗感颗粒的研制[D]. 济南: 山东中医药大学,2013.

WANG G J. The research of Yinqiao anti-flu granules[D]. Jinan: Shandong University of Traditional Chinese Medicine, 2013.

[6] 解静,高杉,李琳,等.网络药理学在中药领域中的研究进展与应用策略[J]. 中草药,2019,50(10):2257-2265.

XIE J, GAO S, LI L, et al. Research progress and application strategy on network pharmacology in Chinese materia medica[J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2019, 50(10): 2257-2265.

[7] 牛明,张斯琴,张博,等.《网络药理学评价方法指南》解读[J]. 中草药,2021,52(14):4119-4129.

NIU M, ZHANG S Q, ZHANG B, et al. Interpretation of network pharmacology evaluation method guidance[J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2021, 52(14): 4119-4129.

[8] 胡钟姣,郑露露,许光亚,等.基于网络药理学和质量源于设计理念的栀子豉汤提取工艺研究[J]. 中草药,2022,53(7):1973-1982.

HU Z J, ZHENG L L, XU G Y, et al. Research on extraction process of Zhizichi Decoction based on network pharmacology and quality by design concept[J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2022, 53(7): 1973-1982.

[9] 杨艳玲,李花花,黄嘉怡,等.基于质量源于设计(QbD)理念的经典名方桃红四物汤的提取工艺研究[J]. 中草药,2022,53(2):403-412.

YANG Y L, LI H H, HUANG J Y, et al. Research of classical prescription based on QbD concept: Optimization of extraction process for modified Taohong Siwu Decoction[J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2022, 53(2): 403-412.

[10] 徐冰,史新元,乔延江,等.中药制剂生产工艺设计空间的建立[J]. 中国中药杂志,2013,38(6):924-929.

XU B, SHI X Y, QIAO Y J, et al. Establishment of design space

- for production process of traditional Chinese medicine preparation [J]. *China J Chin Mater Med*, 2013, 38(6): 924-929.
- [11] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 北京:中国医药科技出版社, 2020: 230-232, 177-178.
China Pharmacopoeia Committee. People's Republic of China (PRC) pharmacopoeia: I [M]. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2020: 230-232, 177-178.
- [12] 丁晓彦, 林志军, 王岱. 金银花-连翘药对的成分和药理作用研究进展[J]. *山东科学*, 2019, 32(3): 36-41.
DING X Y, LIN Z J, WANG D. Research progress on constituents and pharmacological actions of *Lonicerae Japonicae Flos*, *Forsythiae Fructus* and their combination [J]. *Shandong Sci*, 2019, 32(3): 36-41.
- [13] 丁影. 不同配伍比例对金银花-连翘药对中 9 个成分提取率的影响[J]. *中国药师*, 2020, 23(11): 2142-2146.
DING Y. Influence of different compatibility ratios on the dissolution of 9 components in *Lonicerae japonicae Flos* and *forsythiae fructus drug pair* [J]. *China Pharm*, 2020, 23(11): 2142-2146.
- [14] 中国科学院上海有机化学研究所. 化学专业数据库 [DB/OL]. [2023-06-23]. <http://www.organchem.csdb.cn/default.htm>.
Shanghai Institute of Organic Chemistry. Chemical professional da-
- tabase [DB/OL]. [2023-06-23]. <http://www.organchem.csdb.cn/default.htm>.
- [15] 徐宇琴, 陈燕, 傅真杰, 等. 基于网络药理学探究连花清瘟胶囊治疗新冠肺炎的作用机制[J]. *浙江中医药大学学报*, 2021, 45(10): 1154-1161, 1168.
XU Y Q, CHEN Y, FU Z J, et al. Mechanism exploration of *Lianhua Qingwen capsule* against COVID-19 based on network pharmacology [J]. *J Zhejiang Chin Med Univ*, 2021, 45(10): 1154-1161, 1168.
- [16] 刘博文, 戴静, 刘晓凤, 等. 基于网络药理学和设计空间的乳腺康提取工艺研究[J]. *中草药*, 2021, 52(6): 1634-1644.
LIU B W, DAI J, LIU X F, et al. Research on extraction process of *Ruxiankang* based on network pharmacology and design space [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2021, 52(6): 1634-1644.
- [17] 邵静媛, 瞿海斌, 龚行楚. 2 种设计空间计算方法的比较研究: 达标概率法和多指标叠加法[J]. *中国中药杂志*, 2018, 43(10): 2074-2080.
SHAO J Y, QU H B, GONG X C. Comparison of two algorithms for development of design space-overlapping method and probability-based method [J]. *China J Chin Mater Med*, 2018, 43(10): 2074-2080.

(编辑:董宇)