

基于与标准汤剂一致性的甜叶菊配方颗粒提取工艺设计空间研究



吴美兰, 王一芳, 孙小明, 孙立恩

浙江景岳堂药业有限公司 (浙江绍兴 312025)

【摘要】目的 以甜叶菊标准汤剂质量为依据, 建立甜叶菊配方颗粒提取工艺设计空间。**方法** 制备 15 批甜叶菊标准汤剂并测定出膏率、甜菊苷提取量以及新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸总提取量。通过层次分析-熵权法确定各指标的权重系数, 计算标准汤剂的综合评分。以综合评分作为关键质量属性, 以浸泡时间、提取时间、加水倍数为关键工艺参数, 利用 Box-Behnken 设计对甜叶菊配方颗粒提取工艺进行优化, 建立设计空间。对模型准确性、工艺稳定性、工艺适用性进行验证。**结果** 15 批甜叶菊标准汤剂的综合评分范围为 56.77~98.30, 平均值为 78.03。建立的甜叶菊配方颗粒提取设计空间为浸泡时间 10~30 min、加水倍数 11~12 倍, 提取时间 45~55 min。3 个验证点的综合评分为 85.24、85.19、88.25 分, 且同个验证点的重复性良好。不同批次甜叶菊饮片经过设计空间内的工艺参数进行提取, 综合评分也得到较好提升。**结论** 所建立的设计空间能够保证甜叶菊提取工艺的稳定性, 为制备与标准汤剂具有一致性的配方颗粒提供参考思路。

【关键词】 甜叶菊; 配方颗粒; 标准汤剂; 层次分析法; 熵权法; Box-Behnken 设计; 设计空间

【中图分类号】 R283.6 **【文献标识码】** A

Research on the design space of extraction process for Folium stevia formula granules based on consistency with standard decoction

WU Meilan, WANG Yifang, SUN Xiaoming, SUN Lien

Zhejiang Jingyuetang Pharmaceutical Co., Ltd., Shaoxing 312025, Zhejiang Province, China

Corresponding author: SUN Lien, Email: sxadrsun@163.com

【Abstract】Objective Based on the quality of Folium stevia standard decoction, to establish a design space for the extraction process of Folium stevia formula granules. **Methods** 15 batches of Folium stevia standard decoction were prepared, and the paste rate, the extraction amount of steviol glycoside, as well as the total extraction amount of neochlorogenic acid, chlorogenic acid and cryptochlorogenic acid were measured. The comprehensive score of standard decoction were calculated using the analytic hierarchy process-entropy weighting method to determine weight coefficients of each indicator. Using comprehensive evaluation as key quality attribute and soaking time, extraction time, water addition ratio as key process parameters, the Box-Behnken design was used to optimize the extraction process of Folium stevia formula granules and the design space was established. Meanwhile, the accuracy of the model, process stability, and process applicability were validated. **Results** The

DOI: 10.12173/j.issn.2097-4922.202404072

基金项目: 浙江省中医药管理局中药配方颗粒科研专项项目 (浙中医药 [2015] 25 号)

通信作者: 孙立恩, 副主任中药师, Email: sxadrsun@163.com

comprehensive score range for 15 batches of Folium Stevia standard decoction was 56.77-98.30, with an average value of 78.03. The extraction design space for the established Folium Stevia formula granules was as follows: the soaking time was 10-30 min, the water addition ratio was 11-12 times, and the extraction time was 45-55 min. The comprehensive scores of three validation points were 85.24, 85.19 and 88.25, and the repeatability of same validation point was good. The different batches of Folium stevia decoction pieces were extracted using process parameters within the designed space, and the comprehensive score was also significantly improved. Conclusion The established design space can ensure the stability of Folium stevia extraction process and provide reference ideas for preparing formula granules that were consistent with standard decoction.

【Keywords】 Folium stevia; Formula granules; Standard decoction; Analytic hierarchy process method; Entropy weight method; Box-Behnken design; Design space

甜叶菊又名甜菊、甜草、甜茶，是菊科植物甜叶菊 *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Hemsl. 的干燥叶，具有生津止渴、养阴潜阳的功效，主治消渴、头晕^[1]。现代研究表明，甜叶菊富含糖苷类、绿原酸类、黄酮类、多酚类、生物碱等多种功能性成分，在降血糖、降血脂、辅助治疗糖尿病等方面效果明显，可作为中草药或天然药物被开发利用^[2-5]。同时也因其成分甜菊糖苷含量高、热量低，是一种广受欢迎的天然甜味剂^[6]。

甜叶菊配方颗粒是甜叶菊经提取、浓缩、干燥、制粒工艺制备而成的新型配方制剂。甜叶菊配方颗粒的物质基础应与以中医理论为指导、临床应用为基础，经标准化工艺制备而成的甜叶菊标准汤剂具有一致性。其提取工艺等各环节的优化应以标准汤剂的出膏率、有效成分含量范围为依据^[7-8]。在现有的研究中，标准汤剂的质量属性多用于指导配方颗粒质量标准的建立，对工艺的具体指导思路较为少见^[9-10]。本研究将制备 15 批甜叶菊标准汤剂，测定出膏率，甜菊苷提取量，新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸总提取量，通过层次分析-熵权法确定各指标的权重系数，计算综合评分。以标准汤剂的综合评分作为甜叶菊配方颗粒的关键质量属性，利用 Box-Behnken 设计对甜叶菊配方颗粒提取工艺进行优化，建立能够体现与标准汤剂具有一致性的设计空间。

1 材料

1.1 主要仪器

UltiMate 3000 型高效液相色谱仪（美国赛默飞世尔科技）；BT-125D 型十万分之一电子天平（德国赛多利斯）；AE200 型万分之一电

子天平（瑞士梅特勒-托利多）；30B2 型煎药壶（康雅顺电器有限公司）；TC-15 型恒温电热套（海宁市华星仪器厂）；RE-52CS-1 型旋转蒸发仪（上海亚荣仪器有限公司）；LGJ-10C 型冷冻干燥机（北京四环科学仪器厂有限公司）；DL-480E 型超声波清洗器（苏州江东精密仪器有限公司）；HHS-21-8 型电热恒温水浴锅（上海添时科学仪器有限公司）；DHG-9070A 型电热恒温鼓风干燥箱（上海捷呈实验仪器有限公司）。

1.2 主要药品与试剂

新绿原酸（批号：ST06230120，纯度 98.0%）和隐绿原酸（批号：ST07850120，纯度 98.0%）购自上海诗丹德标准技术服务有限公司；绿原酸（批号：110753-201716，纯度 96.8%）和甜菊苷（批号：111515-202104，纯度 93.2%）购自中国食品药品检定研究院；甲醇和乙腈为色谱纯，其余试剂均为分析纯，水为超纯水。

15 批甜叶菊（批号：2022033001~2022033005，产地：安徽省滁州市；批号：2022033006~2022033010，产地：福建省顺昌县；批号：2022033011~2022033015，产地：湖南省安乡县）经浙江景岳堂药业有限公司孙立恩副主任中药师鉴定为菊科植物甜叶菊 *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Hemsl. 的干燥叶，按 2015 年版《浙江省中药炮制规范》检测合格。

2 方法与结果

2.1 甜菊苷的含量测定

2.1.1 色谱条件

采用 Chrom Core AR C₁₈ 色谱柱（250 mm ×

4.6 mm, 5 μm), 以甲醇-0.1% 磷酸溶液 (75:25) 为流动相, 流速为 1.0 mL/min, 柱温为 30 $^{\circ}\text{C}$, 检测波长为 205 nm。理论板数按甜菊苷峰计算应不低于 3 000^[11]。

2.1.2 对照品溶液的制备

取甜菊苷对照品适量, 精密称定, 加 70% 乙醇制成每 mL 含 0.40 mg 的溶液, 作为对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液的制备

取甜叶菊适量 (冻干粉), 研细, 取约 0.1 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 70% 乙醇 50 mL, 密塞, 称定重量, 超声处理 (功率: 250 W, 频率: 40 kHz) 30 min, 放冷, 再称定重量, 用 70% 乙醇补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.1.4 系统适用性试验

分别精密吸取对照品溶液、供试品溶液与空白溶剂 (70% 乙醇), 按“2.1.1”项下色谱条件进样测定, 记录色谱图 (图 1)。结果显示甜菊苷色谱峰分离度良好, 溶剂对含量测定无影响, 专属性符合要求。

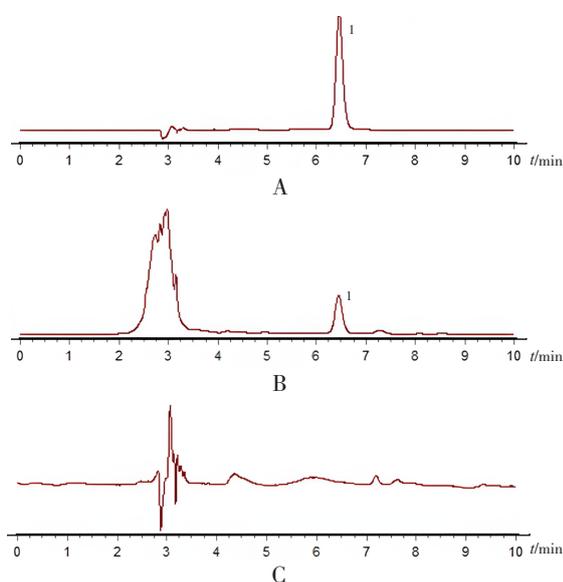


图1 甜菊苷含量测定的HPLC色谱图

Figure 1. HPLC chromatogram of content determination of steviol glycoside

注: A. 对照品; B. 供试品; C. 空白溶剂; 1. 甜菊苷。

2.1.5 线性考察

配制浓度为 41.12、205.60、411.20、616.80、822.40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的甜菊苷系列浓度的对照品溶液, 按“2.1.1”项下色谱条件进样测定, 以甜菊苷浓度为横坐标 (X , $\mu\text{g}/\text{mL}$)、峰面积为

纵坐标 (Y) 绘制标准曲线, 计算得线性回归方程为: $Y=0.0619X+0.3157$ ($r=0.9999$)。结果表明甜菊苷在 41.12~822.40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度范围内线性关系良好。

2.1.6 精密度试验

精密吸取对照品溶液, 按“2.1.1”项下色谱条件连续进样 6 次, 计算得甜菊苷峰面积的 RSD 为 0.17% ($n=6$), 结果表明该仪器精密度良好。

2.1.7 稳定性试验

将供试品溶液分别于室温放置 0、1、2、4、8、12、18、24 h 后, 按“2.1.1”项下色谱条件进样测定, 计算得甜菊苷峰面积的 RSD 为 0.41% ($n=8$), 结果表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.1.8 重复性试验

取同一批样品 6 份, 精密称取 0.1 g, 按“2.1.3”制成供试品溶液, 按“2.1.1”项下色谱条件进样测定, 计算得甜菊苷的平均含量为 213.0 mg/g, RSD 为 0.61% ($n=6$), 结果表明该方法重复性良好。

2.1.9 回收率试验

精密称取样品 6 份, 每份约 0.05 g, 置具塞锥形瓶中, 分别精密移取相对应成分质量的对照品母液, 再依法制成回收率试验供试品溶液, 按“2.1.1”项下色谱条件进样测定, 计算得甜菊苷的平均回收率为 100.6%, RSD 为 0.87% ($n=6$), 结果表明该方法准确度良好。

2.2 新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸的总含量测定

2.2.1 色谱条件

采用 Agilent Eclipse Plus C_{18} 色谱柱 (250 mm \times 4.6 mm, 5 μm), 以 0.1% 磷酸溶液 (A) - 甲醇 (B) 为流动相, 按 0~30 min、80%~75% A 进行梯度洗脱, 流速为 1.0 mL/min, 柱温为 30 $^{\circ}\text{C}$, 检测波长为 325 nm。理论板数按绿原酸峰计算应不低于 3 000^[12]。

2.2.2 对照品溶液的制备

取新绿原酸对照品、绿原酸对照品、隐绿原酸对照品适量, 精密称定, 加 50% 甲醇分别制成每 mL 含 116.40、135.40、127.70 μg 的溶液, 作为对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备

取甜叶菊适量 (冻干粉), 研细, 取约 0.5 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 50% 甲醇 50 mL, 密塞, 称定重量, 超声处理 (功率:

250 W, 频率: 40 kHz) 30 min, 放冷, 再称定重量, 用 50% 甲醇补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.2.4 系统适用性试验

分别精密吸取对照品溶液、供试品溶液与空白溶剂 (50% 甲醇), 按“2.2.1”项下色谱条件进样测定, 记录色谱图 (图 2)。结果显示溶剂对含量测定无影响, 新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸色谱峰分离度良好。

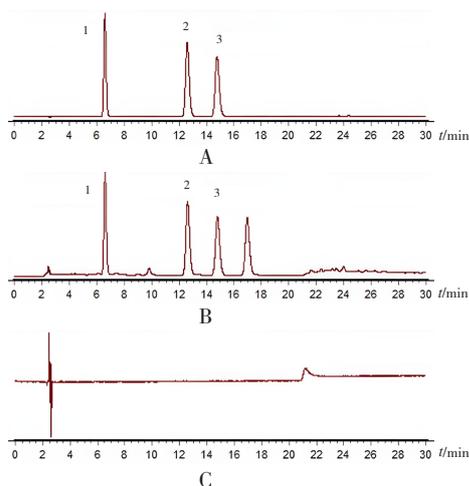


图2 新绿原酸、绿原酸和隐绿原酸总含量测定的 HPLC 色谱图

Figure 2. HPLC chromatogram of total content determination of neochlorogenic acid, chlorogenic acid and cryptochlorogenic acid

注: A. 对照品; B. 供试品; C. 空白溶剂; 1. 新绿原酸; 2. 绿原酸; 3. 隐绿原酸。

2.2.5 线性考察

配制新绿原酸浓度为 11.64、58.22、116.4、174.60、232.90 $\mu\text{g/mL}$, 绿原酸浓度为 13.54、67.72、135.40、203.20、270.90 $\mu\text{g/mL}$, 隐绿原酸浓度为 12.77、63.86、127.70、191.60、255.40 $\mu\text{g/mL}$ 的系列对照品混合溶液, 按“2.2.1”项下色谱条件进样测定, 以对照品浓度为横坐标 (X , $\mu\text{g/mL}$)、峰面积为纵坐标 (Y) 绘制标准曲线, 计算得新绿原酸、绿原酸和隐绿原酸线性回归方程分别为: $Y=0.5313X+0.6649$ ($r=0.9999$)、 $Y=0.5219X+0.7101$ ($r=0.9999$)、 $Y=0.5009X+0.6658$ ($r=0.9999$)。结果表明新绿原酸、绿原酸和隐绿原酸分别在 11.64~232.90、13.54~270.90、12.77~255.40 $\mu\text{g/mL}$ 浓度范围内线性关系良好。

2.2.6 精密度试验

精密吸取混合对照品溶液, 按“2.2.1”项下

色谱条件连续进样 6 次, 计算得新绿原酸、绿原酸和隐绿原酸峰面积的 RSD 分别为 0.49%、0.47%、0.48% ($n=6$), 结果表明该仪器精密度良好。

2.2.7 稳定性试验

将供试品溶液分别于室温放置 0、1、2、4、8、12、18、24 h 后, 按“2.2.1”项下色谱条件进样测定, 计算得新绿原酸、绿原酸和隐绿原酸峰面积的 RSD 分别为 0.27%、0.17%、0.44% ($n=8$), 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

取同一批样品 6 份, 精密称取 0.1 g, 按“2.2.3”项下方法制成供试品溶液, 按“2.2.1”项下色谱条件进样测定, 计算得新绿原酸、绿原酸和隐绿原酸的平均含量为 5.3、12.6、5.9 mg/g, 平均总含量为 23.8 mg/g, RSD 为 0.75% ($n=6$), 结果表明该方法重复性良好。

2.2.9 回收率试验

精密称取样品 6 份, 每份约 0.05 g, 置具塞锥形瓶中, 分别精密移取相对应成分质量的对照品母液, 再依法制成回收率试验供试品溶液, 按“2.2.1”项下色谱条件进样测定, 计算得新绿原酸、绿原酸和隐绿原酸的平均回收率分别为 94.6%、97.5%、93.7%, RSD 分别为 0.62%、0.91%、1.62% ($n=6$), 结果表明该方法准确度良好。

2.3 出膏率的测定

精密量取甜叶菊药液 10 g, 置于已恒重的蒸发皿中, 水浴蒸干, 烘箱 105 $^{\circ}\text{C}$ 下干燥至恒重, 计算出膏率: $\text{mW}/(10\text{M}) \times 100\%$, 其中 m 为 10 g 药液中干浸膏质量, W 为总药液质量, M 为饮片投料质量。

2.4 甜叶菊标准汤剂综合评分的计算

2.4.1 15 批甜叶菊标准汤剂的制备

依据《中药配方颗粒质量控制与标准制定技术要求》, 结合国家中医药管理局《医疗机构中药煎药室管理规范》(国中医药发〔2009〕3 号文), 综合考虑甜叶菊药性、药用部位、质地, 最终确定甜叶菊标准汤剂制备方法如下: 取甜叶菊饮片 100 g, 加水煎煮 2 次, 第 1 次加 12 倍水, 浸泡 30 min, 煎煮 30 min, 第 2 次加 10 倍水, 煎煮 20 min; 趁热过滤 (200 目筛网), 合并 2 次滤液, 65 $^{\circ}\text{C}$ 减压浓缩至约 100 g; 取适量测定出膏率; 剩余浓缩液冷冻干燥, 用于测定指标成分含量。

2.4.2 评价指标权重系数的赋予

①层次分析法。运用层次分析软件 Yaahp V12.9.8167 对各指标进行层次分析。甜菊苷属于糖苷类成分，含量高，将其提取量作为第一重要测定指标；新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸均属于酚酸类成分，含量次于糖苷成分，故作为第二重要测定指标；出膏率可判断制备工艺稳定性，反映总体成分信息，但并非越高越好，出膏率过高会导致制剂成型困难，故作为第三重要测定指标。将3个指标分成3个层次，先后次序为甜菊苷提取量>新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸总提取量>出膏率，依据层次分析法理论1-9标度法^[13]，对各指标进行两两比较，对相对重要程度进行打分，构建判断矩阵，具体见表1。

表1 甜叶菊各指标的判断矩阵表

Table 1. The judgment matrix table for various indicators of Folium stevia

指标	甜菊苷提取量	新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸总提取量	出膏率
甜菊苷提取量	1	2	5
新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸总提取量	1/2	1	3
出膏率	1/5	1/3	1

按几何平均法计算各指标的权重系数，甜菊苷提取量，新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸总提取量，出膏率的权重系数分别为0.5816、0.3090、0.1095。对计算得的各个权重系数进行一致性检验， $CR=CI/RI=0.0036$ ，其中CI为一一致性指标，RI为随机一致性指标，CR为一一致性比率，CR小于0.1说明通过一致性检验，无逻辑性错误，所计算得的权重系数具有科学性。

②熵权法^[14]。运用客观评价辅助软件 Eva Gear V2.7552，采用“标准0-1变换-效益型”对15批甜叶菊标准汤剂测定结果进行标准化处理，采用信息熵权法对各指标进行赋值，结果为

表2 甜叶菊标准汤剂的质量属性与综合评分

Table 2. The quality attributes and comprehensive evaluation of Folium stevia

编号	饮片批号	甜菊苷提取量 (mg/g)	新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸总提取量 (mg/g)	出膏率 (%)	综合评分 (分)
1	2022033001	112.01	8.89	48.30	97.24
2	2022033002	70.43	5.57	30.10	61.02
3	2022033003	72.03	5.56	30.20	61.83
4	2022033004	72.27	4.85	30.10	59.72
5	2022033005	109.78	8.54	46.40	94.54
6	2022033006	99.85	8.08	43.70	87.35
7	2022033007	69.67	5.35	29.10	59.71

甜菊苷提取量，新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸总提取量，出膏率的权重系数分别为0.3370、0.3003、0.3627。

③层次分析-熵权法^[15]。将主观权重与客观权重综合考虑，依据公式1计算综合权重系数，结果为甜菊苷提取量，新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸总提取量，出膏率的综合权重系数分别为0.5966、0.2825、0.1209。

$$W_{\text{综合}} = C_i Q_i / \sum_{i=1}^n C_i Q_i \quad \text{公式 1}$$

其中 C_i 为层次分析法所得权重系数； Q_i 为熵权法所得权重系数； n 为指标个数。

④综合评分计算：依据公式2计算15批甜叶菊标准汤剂的综合评分。

$$Y = [\sum_{i=1}^n (X_i / X_{i-\max}) \times W_{i-\text{综合}}] \times 100 \quad \text{公式 2}$$

其中 X_i 为某个指标的测定值； $X_{i-\max}$ 为某个指标的最大测定值； $W_{i-\text{综合}}$ 为某个指标的综合权重系数； n 为指标个数。

2.4.3 甜叶菊标准汤剂的出膏率与含量测定结果

15批甜叶菊标准汤剂出膏率结果、甜菊苷提取量以及饮片中新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸总提取量结果见表2。根据《中药配方颗粒质量控制与标准制定技术要求》，以70%~130%平均值作为标准汤剂的变异可接受范围，甜菊苷提取量为63.04~117.08 mg/g，新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸总提取量为4.98~9.24 mg/g，出膏率为27.06%~50.25%，综合评分在54.62~101.44分。

2.5 甜叶菊配方颗粒提取工艺设计空间的建立

2.5.1 Box-Behnken设计优化提取工艺

以综合评分较为接近平均值的甜叶菊饮片(批号:2022033015)为研究对象，根据前期研究结果，选择浸泡时间A(10、30、

续表2

编号	饮片批号	甜菊苷提取量 (mg/g)	新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸总提取量 (mg/g)	出膏率 (%)	综合评分 (分)
8	2022033008	77.38	6.35	32.90	67.72
9	2022033009	104.01	8.88	44.60	92.17
10	2022033010	111.55	9.03	49.60	97.76
11	2022033011	106.45	9.08	49.10	95.18
12	2022033012	66.06	5.09	28.10	56.77
13	2022033013	115.58	8.68	47.70	98.30
14	2022033014	77.11	6.30	33.70	67.62
15	2022033015	86.68	6.43	36.10	73.53
平均值		90.06	7.11	38.65	78.03
RSD (% , n=15)		20.78	23.20	21.97	21.48

50 min)、加水倍数 B (8、10、12 倍)、提取时间 C (20、40、60 min) 作为影响因素, 提取次数为 2 次, 过滤目数为 200 目。基于 15 批甜叶菊标准汤剂测定结果以及层次分析-熵权法所得综合权重系数, 以综合评分 (Y) 作为评

价指标。采用 Design-Expert.V8.0.6 软件, 进行 Box-Behnken 试验设计, 优化甜叶菊配方颗粒提取工艺, 设计方案与结果见表 3, 方差分析见表 4。各工艺参数对综合评分的三维响应面图见图 3。

表3 Box-Behnken试验设计方案及综合评分

Table 3. The plan and comprehensive evaluation of Box Behnken experimental design

编号	A	B	C	甜菊苷提取量 (mg/g)	新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸总提取量 (mg/g)	出膏率 (%)	综合评分 (分)
1	0	0	0	94.89	7.18	38.91	80.80
2	-1	0	-1	82.02	6.67	35.70	71.29
3	0	0	0	93.28	7.10	38.05	79.51
4	0	0	0	94.23	7.17	38.46	80.32
5	-1	1	0	94.07	7.31	40.22	81.10
6	1	-1	0	86.48	6.90	36.29	74.95
7	0	1	1	111.07	7.14	42.39	89.88
8	1	1	0	94.00	7.44	40.17	81.46
9	-1	-1	0	82.72	6.81	35.38	72.51
10	1	0	-1	82.02	6.67	35.70	71.79
11	-1	0	1	101.43	6.92	40.45	83.75
12	0	-1	-1	76.22	6.08	33.78	66.49
13	1	0	1	104.26	7.10	40.99	85.90
14	0	0	0	93.31	7.15	38.23	79.73
15	0	0	0	94.72	7.19	38.54	80.66
16	0	1	-1	81.04	6.82	35.71	71.75
17	0	-1	1	93.71	6.69	38.27	78.51

注: 综合评分计算所代入的 $X_{i-\max}$ 为标准汤剂中各指标的最大值。

表4 Box-Behnken试验的回归模型方差分析

Table 4. The analysis of variance of regression model for Box-Behnken experiment

来源	平方和	自由度	均方	F	P
模型	574.27	9	63.81	140.44	<0.000 1
A	3.71	1	3.71	8.17	0.024 4
B	125.85	1	125.85	276.99	<0.000 1
C	402.14	1	402.14	885.11	<0.000 1
残差	3.18	7	0.45		
失拟值	1.90	3	0.63	1.97	0.260 3
纯误差	1.28	4	0.32		
总离差	577.45	16			

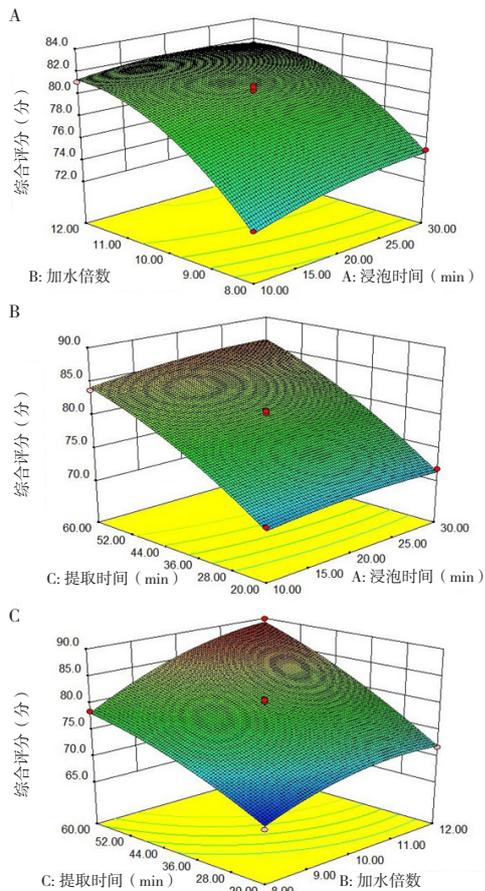


图3 各工艺参数的三维响应面

Figure 3. The 3D response surface diagram of various process parameters

注: A. 加水倍数与浸泡时间; B. 浸泡时间与提取时间; C. 加水倍数与提取时间。

甜叶菊提取工艺模型的回归方程为 $Y = -4.3308 + 0.4804A + 11.5356B + 0.2183C - 0.0260AB + 0.0021AC + 0.0382BC - 0.0058A^2 - 0.528B^2 - 0.0036C^2$ 。模型的显著性检验 $P < 0.0001$; $R^2 = 0.9945$; $R_{adj}^2 = 0.9874$; 失拟项 $P > 0.05$, 表明模型拟合程度高。结果分析对综合评分影响程度是提取时间 > 加水倍数 > 浸泡时间, 其中提取时间与加水倍数对综合评分的交互性影响较为明显。模型的优选条件为浸泡时间 25 min、加 12 倍水、提取时间 60 min, 最优综合评分为 89.4。

2.5.2 甜叶菊提取工艺设计空间

浸泡时间是对甜叶菊提取工艺影响最小的因素, 在 10~30 min 时, 对加水倍数与提取时间的设计空间基本不影响。现以浸泡时间 25 min 作为定值, 建立加水倍数与提取时间的提取工艺设计空间, 选择综合评分大于 15 批标准汤剂综合评

分平均值 (78.03) 作为设计目标最低值, 同时加入置信水平 $\alpha=0.25$ 的置信区间。优化的设计空间通过 Overlay plot 图展示 (图 4)。亮黄色部分是甜叶菊提取工艺优化后的设计空间, 绿色部分是方便操作而进一步优选的设计空间, 即加水倍数为 11~12 倍, 提取时间为 45~55 min。

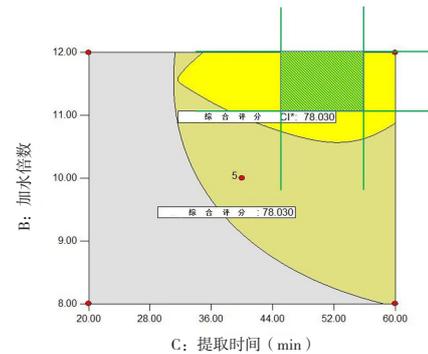


图4 提取工艺的设计空间

Figure 4. The design space for extraction process

2.5.3 设计空间的验证试验

取批号为 2022033015 的甜叶菊饮片, 选取设计空间内 3 个优选点, 平行制备 2 次并测定, 进行模型准确性验证试验, 结果见表 5。3 个优选点实际值的综合评分能够满足要求, 且与理论综合评分的相对误差小于 2%, 说明设计空间可靠, 模型预测功能较好。

取批号为 2022033015 的甜叶菊饮片, 以浸泡时间 25 min、加水倍数 12、提取时间 50 min 为参数进行提取, 平行操作 6 次并测定, 进行工艺稳定性验证。该工艺下的平均出膏率为 41.34%, RSD 为 0.95% ($n=6$); 甜叶菊提取量为 106.11 mg/g, RSD 为 2.16% ($n=6$); 新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸总提取量为 7.19 mg/g, RSD 为 0.91% ($n=6$); 综合评分为 87.22 分, RSD 为 1.47% ($n=6$), 结果表明该工艺的稳定性良好。

选择标准汤剂综合评分相对处于低、中、高水平的 3 批不同产地的甜叶菊饮片 (批号: 2022033002、2022033008、20220330011), 浸泡 25 min、加 12 倍水, 提取 50 min, 平行操作 2 次并测定, 进行工艺适用性验证, 结果见表 6。结果表明该工艺的适用性良好, 不同产地批次的综合评分均满足要求。

2.6 甜叶菊配方颗粒的制备与测定

制备 3 批甜叶菊配方颗粒, 取甜叶菊饮片 (批号: 2022033015) 2 000 g, 加水煎煮 (浸泡

25 min、提取 2 次、加 12 倍水、提取 50 min)，滤过，滤液浓缩成清膏，加入辅料麦芽糊精适量，干燥，再加辅料适量，制粒，制成 1 000 g，即得。

3 批甜叶菊配方颗粒甜菊苷含量分别为 191.2、197.4、184.7 mg/g，新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸总含量分别为 11.3、12.5、13.1 mg/g。

表5 设计空间内操作点的验证实验结果

Table 5. The verification experiment results of operating points in design space

编号	浸泡时间 (min)	加水倍数	提取时间 (min)	理论综合评分 (分)	实际综合评分 (分)	相对偏差 (%)
1	25	11	50	83.71	85.24	1.79
2	25	12	45	84.17	85.19	1.20
3	25	11	55	87.02	88.25	1.39

表6 甜叶菊提取工艺适用性的验证实验结果

Table 6. The validation experiment results on the applicability of Folium stevia extraction process

批号	甜菊苷提取量 (mg/g)	新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸总提取量 (mg/g)	出膏率 (%)	综合评分 (分)	对应标准汤剂的综合评分 (分)	综合评分的提升率 (%)
2022033002	87.25	6.71	34.95	74.43	61.02	22.0
2022033008	89.21	7.20	36.45	77.33	67.72	14.2
2022033011	114.67	9.17	50.05	99.92	95.18	5.0

3 讨论

3.1 标准汤剂评价指标的选择

目前，《中国药典（2020 版）》尚未收载甜叶菊，2015 年版《浙江省中药炮制规范》《浙江省药材标准》中也仅对甜叶菊的来源、性状、鉴别作了规定，未对相关指标成分进行含量测定。甜叶菊中糖苷类、酚酸类成分已明确为功能性成分。赵向阳等^[16]对甜叶菊药材进行了质量提升研究，采用 HPLC 法测定了甜菊苷和莱菔迪苷 A 的含量。张民达等^[17]建立了一测多评法测定甜叶菊中 6 种绿原酸类成分的含量。甜菊苷属于糖苷类的主要成分，新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸 3 种成分含量占了酚酸类的较大比例。因此本研究通过分别测定甜菊苷含量，新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸 3 种酚酸类成分的总含量以及出膏率，从糖苷类、酚酸类、出膏率 3 个方面评价甜叶菊标准汤剂的质量水平。由于甜叶菊受产地、季节、炮制等影响，差异较大，多批次标准汤剂的指标成分含量和出膏率超出均值 $\pm 10\%$ ，各指标 RSD 均超过 20%，故以 70%~130% 平均值作为标准汤剂的变异可接受范围。

3.2 综合评分的计算

应对出膏率、甜菊苷和新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸含量进行科学的综合评价，从而整体体现甜叶菊标准汤剂的质量，以及作为甜叶菊配方颗粒提取工艺的优化指标。层次分析法属于主观赋权法，基于研究者合理主观判断，经过数学方

法处理使之科学量化，并对权重进行一致性检验，排除逻辑性错误。熵权法属于客观赋权法，通过熵值判断指标的离散程度，离散程度越大，表明该指标对综合评价影响越大，权重系数应越大^[18]。层次分析法结合熵权法的综合评分则是将主观权重与客观权重综合考虑，经过分析后，甜叶菊标准汤剂出膏率、甜菊苷提取量及新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸总提取量的权重分别为 0.596 6、0.282 5、0.120 9。

3.3 标准汤剂对提取工艺设计空间的指导

通过试验设计与数学模型建立关键质量属性与关键工艺参数两者的相关性，依据设定的关键质量属性目标，可以建立关键工艺参数的设计空间^[19]。将依据甜叶菊标准汤剂计算出的权重系数应用于甜叶菊提取工艺 Box-Behnken 试验综合评分的计算中，再将标准汤剂的综合评分优选范围作为提取工艺设计空间的关键质量属性目标。最终以大于标准汤剂综合评分平均值（78.03 分）作为综合评分目标范围，代表甜叶菊标准汤剂的中偏上水平。建立的甜叶菊配方颗粒提取设计空间为：浸泡时间 10~30 min、加水倍数 11~12 倍，提取时间 45~55 min。

3.4 提取工艺的验证试验

本研究的验证设计分为 3 个部分：一是模型的验证，取 2022033015 批次，选择设计空间内不同工艺点，设计空间内 3 个验证点的综合评分（85.24、85.19、88.25 分）优于标准汤剂综合评分平均值，实际综合评分与理论综合评分的相对误差均小于

2%。二是工艺稳定性的验证,取 2022033015 批次,取同一个工艺点,进行 6 次重复试验,各指标 *RSD* 均小于 3%。三是工艺适用性的验证,分别选择了 3 批不同产地的饮片,其中 2022033002 批次属于安徽,处于标准汤剂综合评分较低水平;2022033008 批次属于福建,处于中等水平,2022033011 批次属于湖南,处于较高水平。适用性验证试验采用质量不一的饮片,故 3 批验证结果综合评分离散度大,但提取综合评分相比标准汤剂综合评分均有所提高。表明不同批次甜叶菊饮片经过设计空间内的工艺参数进行提取,综合评分能达到较好的提升,低水平饮片地有效成分也能得到充分提取,接近标准汤剂综合评分中心值,利于制备成高质量的配方颗粒。

3.5 小结

本研究通过层次分析-熵权法对甜叶菊标准汤剂进行科学的综合评价,以标准汤剂的综合评分作为甜叶菊配方颗粒提取工艺设计空间的指导原则。所建立的设计空间不仅充分体现了标准汤剂的质量属性,而且能保证甜叶菊提取工艺的稳定性及适用性,为制备与标准汤剂具有一致性的中药配方颗粒提供思路。

参考文献

- 殷佳,潘晔,蔡雪滕,等. 中药传统汤剂、浸膏剂和配方颗粒剂的比较[J]. 中草药, 2017, 48(18): 3871–3875. [Yin J, Pan Y, Cai XM, et al. Comparison on traditional decoction, concrete and formula granules of Chinese materia medica[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2017, 48(18): 3871–3875.] DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.18.030.
- 李亚辉,罗敏花,高庆超,等. 甜叶菊主要功能性成分研究进展[J]. 中国糖料, 2023, 45(2): 33–40. [Li YH, Luo MH, Gao QC, et al. Recent progress on main functional components of Stevia rebaudiana[J]. Sugar Crops of China, 2023, 45(2): 33–40.] DOI: 10.13570/j.cnki.scc.2023.02.005.
- Randive DS, Bhutkar MA, Bhinge SD, et al. Hypoglycemic effects of Lagenaria siceraria, Cynodon dactylon and Stevia rebaudiana extracts[J]. J Herbmed Pharmacol, 2019, 8(1): 51–55. DOI: 10.15171/jhp.2019.09.
- Sudha T, Devi DA, Kaviarasan L. Antihyperlipidemic effect of Stevia rebaudiana on alloxan induced diabetic rats[J]. Asian J Pharm Technol, 2017, 7(4): 202. DOI: 10.5958/2231-5713.2017.00031.9.
- Matias FBR, Castro DF, Bernardo NJLC. Stevia rebaudiana leaf extract reduces blood glucose and visceral fat accumulation in alloxan-induced diabetic mice[J]. J Microb Biotech Food, 2021, 10(5): e3347. DOI: 10.15414/JMBFS.3347.
- 刘琼,潘芸芸,吴卫. 甜叶菊化学成分及药理活性研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2018, 30(6): 1085–1091. [Liu Q, Pan YY, Wu W. Review on chemical compositions and pharmacological activities of Stevia rebaudiana (Bertoni) Hems[J]. Natural Product Research and Development, 2018, 30(6): 1085–1091.] DOI: 10.16333/j.1001-6880.2018.6.027.
- 陈士林,刘安,李琦,等. 中药饮片标准汤剂研究策略[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(8): 1367–1375. [Chen SL, Liu A, Li Q, et al. Research strategies in standard decoction of medicinal slices[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2016, 41(8): 1367–1375.] DOI: 10.4268/cjcm.20160801.
- 杨鹤年,张津铤,吴宿慧,等. 中药配方颗粒制备工艺、质量评价、与传统汤剂一致性的研究现状分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(8): 266–274. [Yang HN, Zhang JC, Wu SH, et al. Research on preparation process and quality evaluation of Traditional Chinese Medicine dispensing granules and its consistency with traditional decoction: a review[J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2023, 29(8): 266–274.] DOI: 10.13422/j.cnki.syfx.20220653.
- 张志鹏,徐杰,刘佩仪,等. 基于标准汤剂的鲜地黄配方颗粒质量标准研究[J]. 中草药, 2023, 54(4): 1127–1137. [Zhang ZP, Xu J, Liu PY, et al. Study on quality standard of fresh Rehmanniae radix formula granules based on standard decoction[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2023, 54(4): 1127–1137.] DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.04.012.
- 张智远,丁洁,曹桂云,等. 基于标准汤剂的槲寄生配方颗粒质量标准研究[J]. 中成药, 2022, 44(9): 2793–2798. [Zhang ZY, Ding J, Cao GY, et al. Quality standard for Hujisheng formula granules based on standard decoction[J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2022, 44(9): 2793–2798.] DOI: 10.3969/j.issn.1001-1528.2022.09.008.
- 罗勇为,钟晓燕,姚满芳,等. 色谱法测定甜叶菊叶片及其提取物中甜菊糖总苷含量的研究[J]. 甘蔗糖业, 2020, 49(6): 53–59. [Luo YW, Zhong XY, Yao MF, et al. Determination of stevia glycosides in Stevia Leaves and extracts by high performance liquid chromatography[J]. Sugarcane and Cane Sugar, 2020, 49(6): 53–59.] DOI: 10.3969/j.issn.1005-9695.2020.06.010.
- 付晓,尹忠平,上官新晨,等. HPLC 法同时测定甜叶菊中 3 种绿原酸类化合物[J]. 食品科技, 2014, 39(8): 276–280. [Fu X, Yin ZP, Shanguan XC, et al. HPLC simultaneous determination of three caffeoylquinic acids in leaves of Stevia rebaudiana Bertoni[J]. Food Science and Technology, 2014, 39(8): 276–280.] DOI: 10.13684/j.cnki.spkj.2014.08.061.
- 祝宇,余世荣,张晓燕,等. 层次分析联合 Box-Behnken 响应面法优选复方肉苁蓉合剂提取工艺[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(23): 2852–2858. [Zhu Y, Yu SR, Zhang XY, et al. Optimization of extraction process for compound Roucongrong mixture by analytic hierarchy process combined with Box-Behnken response surface methodology[J]. Chinese Journal of Modern Applied Pharmacy, 2020, 37(23): 2852–2858.] DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2020.23.006.
- 谢谭芳,程哲,覃春捷. 层次分析-熵权法结合星点设

- 计 - 响应面法优选艾纳香配方颗粒成型工艺[J]. 中国药业, 2023, 32(13): 50-55. [Xie TF, Cheng Z, Qin CJ, et al. Optimization of molding process of Ainaxiang formula granules by analytic hierarchy process-entropy weight method combined with central composite design - response surface methodology[J]. China Pharmaceuticals, 2023, 32(13): 50-55.] DOI: [10.3969/j.issn.1006-4931.2023.13.012](https://doi.org/10.3969/j.issn.1006-4931.2023.13.012).
- 15 黎桃敏, 彭帮贵, 张兰兰, 等. 陈皮配方颗粒提取工艺的优化[J]. 中国医药工业杂志, 2023, 54(8): 1241-1246. [Li TM, Peng BG, Zhang LL, et al. Optimization of extraction process for Tangerine Peel formula granules[J]. Chinese Journal of Pharmaceuticals, 2023, 54(8): 1241-1246.] DOI: [10.16522/j.cnki.cjph.2023.08.014](https://doi.org/10.16522/j.cnki.cjph.2023.08.014).
- 16 赵向阳, 余秀萍, 吴玮, 等. 甜叶菊药材品质与质量提升研究[J]. 安徽医药, 2023, 27(10): 1937-1940, 2122. [Zhao XY, Yu XP, Wu W, et al. Research on improvement of the qualities of Stevia rebaudiana (bertoni) hems[J]. Anhui Medical and Pharmaceutical Journal, 2023, 27(10): 1937-1940, 2122.] DOI: [10.3969/j.issn.1009-6469.2023.10.007](https://doi.org/10.3969/j.issn.1009-6469.2023.10.007).
- 17 张民达, 刘梦婷, 李小莹, 等. 一测多评法测定甜叶菊中 6 种绿原酸类成分的含量[J]. 中国现代中药, 2020, 22(6): 879-883. [Zhang MD, Liu MT, Li XY, et al. Determination of six chlorogenic acids in Stevia rebaudiana by one-test multi-evaluation method[J]. Modern Chinese Medicine, 2020, 22(6): 879-883.] DOI: [10.13313/j.issn.1673-4890.20190702006](https://doi.org/10.13313/j.issn.1673-4890.20190702006).
- 18 韩云凤, 唐茜, 石懿, 等. 基于熵权法 - 层次分析法结合响应面法优化养阴润目颗粒的提取工艺[J]. 中国现代应用药学, 2022, 39(7): 896-903. [Han YF, Tang X, Shi Y, et al. Optimization of extraction process for Yangyin Runmu granules by Box-Behnken design based on entropy weight method-analytic hierarchy process method[J]. Chinese Journal of Modern Applied Pharmacy, 2022, 39(7): 896-903.] DOI: [10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2022.07.006](https://doi.org/10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2022.07.006).
- 19 姜慧洁, 黄薇, 胡林水, 等. 基于质量源于设计 (QbD) 理念的延胡索醇提工艺质量控制研究[J]. 中草药, 2020, 51(2): 372-380. [Jiang HJ, Huang W, Hu LS, et al. Quality control of ethanol extraction process of Corydalis rhizoma based on quality by design (QbD)[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2020, 51(2): 372-380.] DOI: [10.7501/j.issn.0253-2670.2020.02.013](https://doi.org/10.7501/j.issn.0253-2670.2020.02.013).

收稿日期: 2024 年 04 月 11 日 修回日期: 2024 年 07 月 08 日
本文编辑: 钟巧妮 李 阳