考虑药材批次间质量差异的银杏叶提取物制备工艺多参数优化研究

王元远[1,2]，李今豪[1,2]，姚建标[3]，刘　豪[3]，龚行楚[1,2,4,5]*

（1. 天津中医药大学中药制药工程学院，天津 300193；2. 浙江大学金华研究院，浙江金华 321016；3. 浙江康恩贝制药股份有限公司，浙江杭州 310058；4. 浙江大学药学院，浙江杭州 310058；5. 现代中药创制全国重点实验室，浙江杭州 310058）

摘要：采用确定性筛选试验设计优化了银杏叶提取物的制备工艺，考察了多批次银杏叶药材与 12 个工艺参数的影响。确定工艺评价指标为干物质含量、总黄酮醇苷含量、总萜类内酯含量、总有机酸含量，进而识别出关键原料参数（CMAs）为药材中的异鼠李素含量、银杏内酯 C 含量和原儿茶酸含量，关键工艺参数（CPPs）为提取乙醇体积分数、水沉体积、洗涤乙醇体积分数、洗涤体积、洗脱体积。建立了 CMAs、CPPs 与工艺评价指标之间的数学模型。根据风险大小确定了设计空间并推荐了稳健的操作空间。在操作空间内操作能确保银杏叶提取物的质量。该参数优化方法适用于在药材质量批次间存在差异时，制备获得质量较为一致的提取物，具有良好的推广应用前景。

关键词：银杏叶提取物；工艺优化；试验设计；关键原料参数；设计空间

中图分类号：R917；R284.2　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255(2025)03-0378-11

引用：王元远，李今豪，姚建标，等．考虑药材批次间质量差异的银杏叶提取物制备工艺多参数优化研究［J］．中国医药工业杂志，2025, 56(3): 0378-0388．DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2025.03.012

Research on Multi-Parameter Optimization of the Process of *Ginkgo biloba* Leaf Extract Considering Quality Variations among Raw Material Batches

WANG Yuanyuan[1,2], LI Jinhao[1,2], YAO Jianbiao[3], LIU Hao[3], GONG Xingchu[1,2,4,5]*

(*1. College of Pharmaceutical Engineering of Traditional Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193; 2. Jinhua Institute of Zhejiang University, Jinhua 321016; 3. Zhejiang Conba Pharmaceutical Co., Ltd., Hangzhou 310058; 4. College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058; 5. National Key Lab. of Chinese Medicine Modernization, Hangzhou 310058*)

ABSTRACT: This study optimized the preparation process of *Ginkgo biloba* leaf extract using a deterministic screening experimental design, investigating the impacts of multiple batches of *Ginkgo biloba* leaf raw materials and 12 process parameters. The process evaluation indexes were determined as dry matter content, total flavonoid glycoside content, total terpenoid lactone content, total organic acid content. Critical material attributes (CMAs) were identified as the contents of isorhamnetin, ginkgolide C, and protocatechuic acid in raw materials. Critical process parameters (CPPs) were identified as the volume fraction of ethanol for extraction, the volume of water used in the water sedimentation, volume fraction of ethanol for washing, washing volume, and elution volume. The mathematical models were established between CMAs, CPPs, and process evaluation indexes. The design space was determined based on the risk level, and a robust operating space was recommended. Operating within the operating space ensures the quality of the *Ginkgo biloba* leaf extract. The established parameter optimization method is applicable when there are variations in the quality of raw material batches, and it can be used to prepare extracts with more consistent quality, showing promising potential for widespread application.

Key Words: *Ginkgo biloba* leaf extract; process optimization; experimental design; critical material parameter; design space

银杏叶提取物收录于 ChP 2020 年版一部，主要有效成分包括黄酮醇苷类、萜类内酯类和有机酸类[1—2]。其中，黄酮醇苷类成分能增加脑血管流量，预防血栓形成[3]；银杏内酯类成分可治疗急性胰腺炎和延缓衰老，还具备调节神经递质和神经调质的功能，起到保护神经的作用[4]；有机酸类成分具有抗病毒、抗氧化和神经保护作用[5—6]。

银杏叶提取物的制备涵盖提取、浓缩、水沉、纯化和干燥等步骤，如图 1 所示。已有研究集中于优化工艺参数[7]和改进纯化技术[8—9]。如毕艳艳等[10]通过 Box-Behnken 设计优化纯化工艺，得到的银杏叶提取物总黄酮质量分数高达 35.77%，收率为 93.30%。ABOUHEIF 等[11]报道使用氯化胆碱、抗坏血酸和纯水提取银杏叶时，银杏内酯得率最高。冯靖[9]报道大孔树脂 HPD-100 为银杏叶黄酮的最佳纯化吸附树脂，并优化了柱色谱和喷雾干燥的工艺参数。

然而，目前的大多数研究在参数优化时未考虑银杏叶原料的批间质量差异可能带来的影响[12]。钟文等[13]指出药材质量的波动很可能是引起中药制剂产品质量波动的主要原因。本课题组已经尝试在试验设计中搭配使用不同批次的药材，再根据结果优化中药制药的工艺参数，取得了较好效果[14—15]。

基于此，本研究在考虑银杏叶药材批次间质量差异的情况下优化银杏叶提取物的制备工艺参数。首先，测定多个批次银杏叶药材中的黄酮醇苷类、萜类内酯类、有机酸类和浸出物含量，并利用相关性分析确定潜在的关键原料参数。其次，通过鱼骨图列出了整个工艺中可能存在的影响因素，并通过文献调研筛选出潜在的关键工艺参数。采用确定性筛选试验设计，系统研究药材批次和多过程工艺参数对提取物中各类成分含量的影响规律，并通过建模筛选出关键原料参数与关键工艺参数。最后，采用基于穷举法－蒙特卡罗法计算设计空间并进行验证，得出最佳关键工艺参数。具体试验示意图如图 2 所示，期望通过参数优化缩小药材批间质量波动对提取物质量的影响。

1 仪器与试药

XSR105DU 型电子分析天平（瑞士 Mettler Toledo 公司）；1260 型高效液相色谱仪和 Infinitylab LC/MSD 型液相色谱质谱联用仪（美国 Agilent 公司）；4500 型液相色谱串联质谱仪（美国 AB-SCIEX QTRAP 公司）。

D- 奎宁酸（D-quinic acid，QA，含量 >98 %，批号 220128）、莽草酸（shikimic acid，SA，含量 >98 %，批号 211225）、对羟基苯甲酸（*p*-hydroxybenzoic acid，含量 > 98%，批号 220309）、原儿茶酸（protocatechuic acid，PA，含量 >98%，批号 220305）和没食子酸（gallic acid，GA，含量 > 98%，批号 220420）均购自上海融禾医药科技发展有限公司；6- 羟基犬尿喹啉酸（6-hydroxykynurenic acid，6-HKA，成都有机化学研究所，含量≥ 98%，批号 20230326）；槲皮素（上海麦克林生化科技有限公司，规格 20 mg，含量 >97%，批号 Q817161）；银杏内酯 A（ginkgolide A，GA，规格 100 mg，含量 >98%，批号 FY-1756-B）、山柰酚（规格 20 mg，含量 > 95%，批号 FY-1594-BD）（南通飞宇生物科技有限公司）；异鼠李素（江苏艾康生物医药研发有限公司，规格 20 mg，含量 >98 %，批号 R019542）；白果内酯（bilobalide，BB，上海阿拉丁生化科技股份有限公司，含量 >98 %，批号 B121932-100 mg）；银杏内酯 B（ginkgolide B，GB，杭州辰通生化科技有限公司，批号 G101969，规格 50 mg，含量 > 99%）；银杏内酯 C（ginkgolide C，GC，上海笛柏生物科技有限公司，规格 50 mg，含量 >98%，批号 K918774）；甲醇、乙腈、甲酸、磷酸为色谱纯，无水乙醇为分析纯，水为纯化水。

树脂由浙江康恩贝制药股份有限公司提供。不同批次的银杏叶药材信息如表 1 所示，药材均经浙江大学龚行楚副教授鉴定并确认。

2 方法与结果

2.1 银杏叶提取物的制备

将干燥的银杏叶粉碎并过 4 号筛（孔径为 0.25 mm），保存于干燥容器中备用。称取粉末 60 g，用乙醇溶液回流提取 2 次。提取液过滤后合并，再减压浓缩至适量，然后加入水搅拌 40 min，于 4 ℃静置 12 h。最后，减压过滤，收集上清液。

收稿日期：2024-09-19
基金项目：浙江省科技计划项目（2022C03142）
作者简介：王元远（2000—），女，硕士研究生，专业方向：中药质量控制。
通信作者：龚行楚（1982—），男，副教授，从事中药制药工程研究。E-mail：gongxingchu@zju.edu.cn

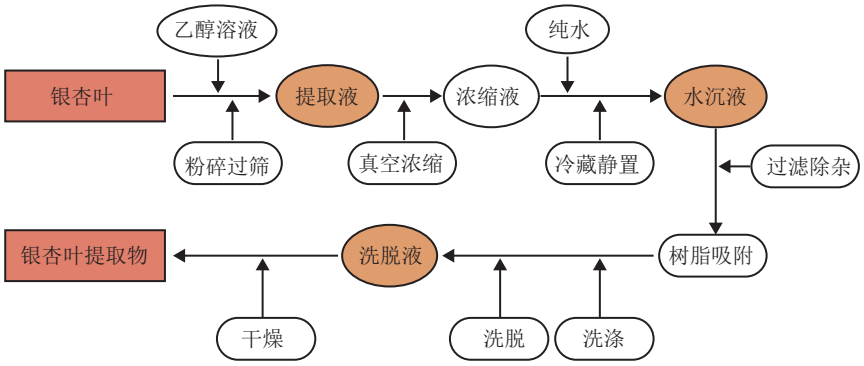


图 1　银杏叶提取物制备工艺

Fig.1　Preparation Process of *Ginkgo biloba* Extract

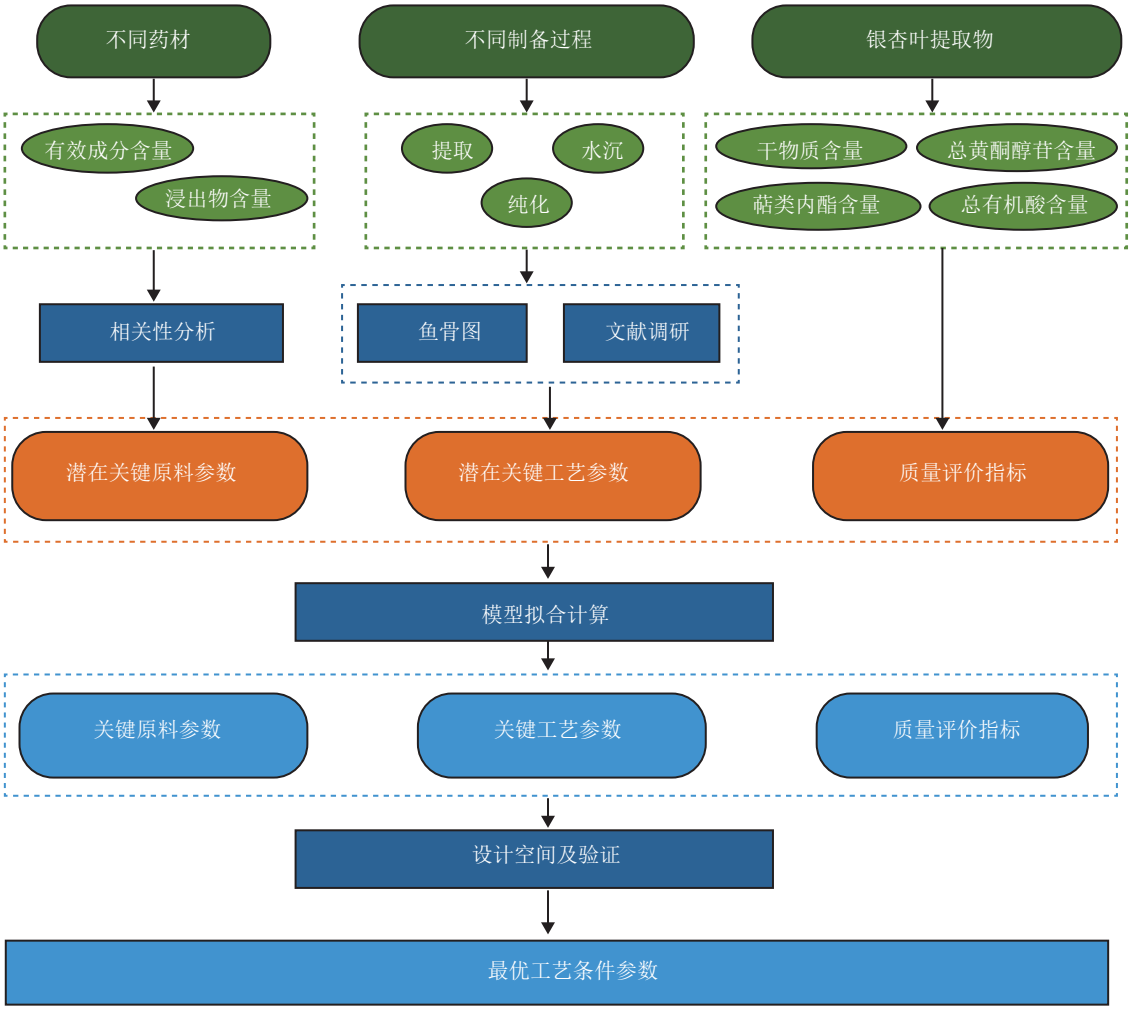


图 2　参数优化步骤示意图

Fig.2　Schematic Diagram of Parameter Optimization Steps

纯化银杏叶提取物前，先预处理树脂，即树脂用纯水冲洗后在 95%乙醇中浸泡 24 h，再冲洗至无醇味。湿法装柱后，使上述所得的上清液通过色谱柱，先以稀乙醇洗涤，后用乙醇溶液洗脱。洗脱液浓缩

表 1 银杏叶药材的来源及批号

Tab.1 Sources and Batch Numbers of *Ginkgo biloba* Leaf

编号	药材批号	药材厂家
M1	20231225	亳州市大西北药业有限公司
M2	20231205	杰馨生物科技有限公司
M3	20231214	宸瑜本草有限公司
M4	20231203	安徽美康药业科技有限公司
M5	20231210	亳州市浩义堂生物科技有限公司
M6	20231220	安徽美康药业科技有限公司
M7	20231225	杰馨生物科技有限公司
M8	20231228	圣源堂药业有限公司

后减压干燥，得粉末。树脂再生时先用95%乙醇淋洗，再用纯水冲洗。

2.2 试验设计

结合实际工业生产经验与文献调研结果，将提取与水沉过程中提取乙醇的体积分数（X_1/%）、提取时间（X_2/h）、料液比［X_3/(g·mL^{-1})］、水沉体积［X_4/(mL·g^{-1})，即每 1 g 银杏叶加入的溶剂体积］、柱色谱过程的色谱柱高径比［X_5/(cm·cm^{-1})］、上样流量［X_6/(BV·h^{-1})］、洗涤乙醇体积分数（X_7/%）、洗涤体积（X_8/BV）、洗涤流量［X_9/(BV·h^{-1})］、洗脱乙醇的体积分数（X_{10}/%）、洗脱体积（X_{11}/BV）和洗脱流量［X_{12}/(BV·h^{-1})］作为待研究的工艺参数。使用表 1 中 8 批银杏叶原料，在试验设计中研究了提取、水沉和柱色谱 3 个不同过程中的共 12 个参数。为了减少试验次数，采用确定性筛选设计。将干物质含量（Y_1/%）、总黄酮醇苷含量（Y_2/%）、总萜类内酯含量（Y_3/%）和总有机酸含量（Y_4/%）作为工艺评价指标。试验方案及结果如表 2 所示。

2.3 分析方法

2.3.1 银杏叶的分析方法

2.3.1.1 银杏叶中黄酮醇苷类成分、萜类内酯类成分和有机酸类含量的测定

采用 HPLC 法[16]测定银杏叶中黄酮醇苷类的含量，银杏叶中萜类内酯类含量测定采用液质联用法[16]，银杏叶中有机酸类含量测定采用 HPLC 法[17]（具体数据编辑部留存）。

2.3.1.2 银杏叶中浸出物的测定

各批次药材中浸出物的测定采用 ChP 2020 年版中所述方法：分别取 8 批银杏叶粉末，各 2 g，分别精密称定，置 100 mL 的锥形瓶中，精密加入 70%乙醇 50 mL，密塞，精密称定；静置 1 h 后，连接回流冷凝管，加热至沸腾，并保持微沸 1 h。放冷后，取下锥形瓶，密塞，再精密称定，补足减失的质量，摇匀；用干燥滤器过滤，精密量取滤液 25 mL，置已干燥至恒重的蒸发皿中，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，照式①计算浸出物含量。

$$\text{浸出物含量}=\frac{\text{提取物干物质量 (g)}}{\text{银杏叶粉烘干后质量 (g)}}\times 100\% \qquad ①$$

2.3.2 银杏叶提取物的分析方法

2.3.2.1 银杏叶提取物中黄酮醇苷类成分、萜类内酯类成分和有机酸类含量测定

银杏叶提取物中黄酮醇苷类成分和萜类内酯成分含量的测定通过 LC-MS 法[18]进行分析，银杏叶提取物中有机酸类成分的含量通过 HPLC 法[19]测定（具体数据编辑部留存）。

2.3.2.2 银杏叶提取物中干物质含量的测定

采用称重法测定干物质含量。称取适量待测样品，置已干燥至恒重的称量瓶中，置干燥箱中在 105 ℃下干燥 3 h。精密称定，计算样品对应的干物质含量。

2.4 数据处理

银杏叶提取物中活性成分含量按式②计算。

$$\text{活性成分含量}=\frac{\text{活性成分质量 (g)}}{\text{干物质质量 (g)}}\times 100\% \qquad ②$$

通过 Design Expert 13.0 软件（美国 Stat-Ease Inc.）对确定性筛选设计的结果进行分析。采用多元线性回归法，用式③建立工艺评价指标和原料参数及工艺参数的定量模型，筛选出关键原料参数及关键工艺参数。

$$Y=a_0+\sum_{i=1}^{f}b_iX_i+\sum_{k=1}^{g}c_kZ_k \qquad ③$$

式中：Y 是各工艺的评价指标，即 Y_1、Y_2、Y_3 和 Y_4；a_0 为常数；b_i、c_k 为偏回归系数；f 为潜在关键工艺参数的数量；g 为潜在关键原料参数的数量；X_i 为潜在关键工艺参数，Z_k 为潜在关键原料参数。

采用逐步回归法对模型进行简化，添加及删除模型中各项的显著性水平设为 0.05，模型中剩余的

表 2　确定性筛选试验设计的方案及结果

Tab.2　Scheme and Results of the Deterministic Screening Experimental Design

试验序号	银杏叶编号	X_1/%	X_2/h	X_3/(g·mL^{-1})	X_4/(mL·g^{-1})	X_5/(cm·cm^{-1})	X_6/(BV·h^{-1})	X_7/%	X_8/BV	X_9/(BV·h^{-1})	X_{10}/%	X_{11}/BV	X_{12}/(BV·h^{-1})	Y_1/(mg·g^{-1})	Y_2/%	Y_3/%	Y_4/%
1	M1	90	1	8	1	10	2.0	30	2.0	1.5	80	4	1.0	4.21	8.54	48.89	7.93
2	M1	90	2	16	1	6	2.0	10	1.0	2.0	80	4	1.0	17.27	1.00	17.76	0.87
3	M1	90	3	16	1	10	1.0	10	2.0	1.0	80	2	1.0	6.94	3.06	33.66	7.61
4	M1	90	3	8	1	6	1.0	30	2.0	2.0	60	2	1.5	11.06	1.61	19.25	2.50
5	M2	50	1	8	1	6	1.0	10	1.5	2.0	80	4	2.0	8.66	2.65	39.94	2.80
6	M2	50	3	8	1	10	2.0	10	2.0	1.0	60	4	2.0	5.71	3.47	46.14	5.39
7	M2	50	3	16	1	6	2.0	30	1.0	1.0	80	2	2.0	6.26	2.69	33.50	2.76
8	M2	90	1	12	1	10	2.0	30	1.0	2.0	60	2	2.0	12.01	1.75	32.12	3.92
9	M3	50	3	16	1	6	1.5	30	2.0	2.0	60	4	1.0	8.04	0.40	62.14	2.79
10	M3	50	3	8	1	10	2.0	10	1.0	2.0	70	2	1.0	9.66	0.59	54.11	2.44
11	M3	90	1	16	1	6	2.0	10	2.0	1.0	60	3	2.0	5.92	0.20	59.15	1.82
12	M3	70	1	8	1	6	1.0	10	1.0	1.0	60	2	1.0	5.99	0.66	67.29	2.16
13	M4	50	1	16	1	10	1.0	20	2.0	2.0	80	2	2.0	7.23	1.17	29.79	4.30
14	M4	90	3	8	1	8	1.0	30	1.0	1.0	80	4	2.0	5.27	0.73	26.11	3.31
15	M4	50	1	16	1	10	1.0	30	1.0	1.0	60	4	1.0	16.22	0.24	9.27	1.93
16	M4	90	3	16	3	6	1.0	10	1.0	2.0	60	4	2.0	5.06	1.24	40.48	6.18
17	M5	70	2	12	3	8	1.5	20	1.5	1.5	70	3	1.5	2.86	2.93	26.07	3.64
18	M5	50	1	8	3	6	2.0	30	2.0	1.0	80	2	1.0	1.92	2.77	41.09	5.90
19	M5	70	2	12	3	8	1.5	20	1.5	1.5	70	3	1.5	3.33	6.71	45.01	4.74
20	M5	70	2	12	3	8	1.5	20	1.5	1.5	70	3	1.5	1.79	3.32	45.57	5.22
21	M6	70	2	12	3	8	1.5	20	1.5	1.5	70	3	1.5	8.54	2.70	32.51	1.86
22	M6	70	2	12	3	8	1.5	20	1.5	1.5	70	3	1.5	5.75	1.91	44.66	3.19
23	M6	50	3	16	5	6	1.0	10	1.0	1.5	60	2	2.0	1.78	3.93	65.56	9.38
24	M6	50	1	16	5	10	2.0	10	1.0	1.0	80	4	1.5	2.76	0.88	58.67	4.05
25	M7	90	1	16	5	6	1.0	30	1.0	2.0	80	2	1.0	11.12	1.99	24.06	1.92
26	M7	50	3	8	5	10	1.0	30	1.0	2.0	80	3	1.0	6.63	2.95	36.30	4.00
27	M7	90	3	8	5	6	2.0	10	2.0	2.0	80	2	2.0	10.14	6.14	42.21	4.20
28	M7	50	2	8	5	10	1.0	30	2.0	1.0	60	2	2.0	5.38	1.20	30.23	2.48
29	M8	90	3	8	5	6	2.0	20	1.0	1.0	60	4	1.0	8.42	0.13	18.11	1.92
30	M8	50	1	16	5	8	2.0	10	2.0	2.0	60	2	1.0	9.95	0.51	27.46	0.89
31	M8	90	1	8	5	10	1.0	10	2.0	2.0	60	4	1.0	12.61	0.05	18.92	1.31
32	M8	50	1	8	5	6	2.0	30	1.0	2.0	60	4	2.0	4.41	3.89	36.33	5.96
33	M8	90	1	16	5	6	1.0	30	2.0	1.0	70	4	2.0	2.36	1.12	40.32	5.46
34	M6	70	3	16	5	10	2.0	30	2.0	2.0	80	4	2.0	6.65	1.98	55.22	2.54
35	M6	50	3	12	5	6	1.0	10	2.0	1.0	80	4	1.0	6.95	2.04	51.87	1.97
36	M2	90	3	16	5	10	2.0	30	1.5	1.0	60	2	1.0	5.31	3.81	57.52	4.33
37	M3	90	1	8	5	10	1.5	10	1.0	1.0	80	2	2.0	12.81	0.38	64.07	1.12

项可认为是关键原料参数及关键工艺参数。

按式④建立银杏叶关键原料参数、关键工艺参数和工艺评价指标之间的定量模型。

$$Y = c_0 + \sum_{i=1}^{n} c_i X_{h,i} + \sum_{i=1}^{n} c_{vi} X_{h,i}^2 + \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^{n} c_{ii} X_{h,i} X_{h,j} + \sum_{k=1}^{m} d_v Z_{h,k} \quad ④$$

式中：n 和 m 分别是关键工艺参数和关键原料参数的数量；c_0 是常数；c_i、c_{vi}、c_{ii} 和 d_v 是偏回归系数；$X_{h,i}$ 和 $X_{h,j}$ 是关键工艺参数；$Z_{h,k}$ 是关键原料参数。采用逐步回归法精简该模型，添加和删除模型中各项的显著性水平均设定为 0.10。

采用基于穷举法－蒙特卡罗法计算基于风险大小的设计空间[19—20]。用计算后不达标的概率值定量描述风险大小，并衡量设计空间的可靠程度，可接受的最高风险值设置为 20%。计算过程简要说明如下。假定试验结果呈正态分布。正态分布的平均值被假定为测得的响应值。然后，通过蒙特卡罗法模拟根据正态分布创建的代表试验值的随机值[21—22]。每次模拟后，获得工艺评价指标的新方程。再根据模型的预测结果计算不达标的概率值，从而定量描述风险的大小[23—24]。本试验的模拟次数为 500 次，所有计算均使用 MATLAB(R2022a) 软件进行。

2.5 筛选潜在的关键工艺参数

通过鱼骨图列出可能存在影响的参数。银杏叶提取物制备过程的鱼骨图分析如图 3 所示。银杏叶提取物的制备过程涉及银杏叶提取、浓缩液水沉、色谱柱纯化、银杏叶药材和环境 5 个方面。通过单因素试验确定提取次数为 2 次，洗脱液减压干燥的温度为 55 ℃（具体数据编辑部留存）。基于前期文献整理以及实际生产经验，本研究确定的、需要进一步通过试验设计来优化的潜在关键工艺参数影响因素为以下 12 个：醇提过程的提取乙醇体积分数、提取时间、料液比；浓缩液水沉过程的水沉体积；柱色谱纯化过程的色谱柱高径比、上样流量、洗涤乙醇体积分数、洗涤体积、洗涤流量、洗脱乙醇体积分数、洗脱体积和洗脱流量。

2.6 银杏叶药材的潜在关键原料参数

根据“**2.3.1**”项下方法对银杏叶药材中黄酮醇苷类、萜类内酯类和有机酸类成分的含量进行测定，测定结果如表 3 所示。由表 3 可以明显看出，在银杏叶提取物中，槲皮素（Z_1）和山柰酚（Z_2）的含量相对较高。在 4 种检测的萜类内酯中银杏内酯 C(Z_6) 含量最高。在有机酸的组成中，原儿茶酸（Z_9）、6-羟基犬尿喹啉酸（Z_{10}）的含量较高。

对各批次银杏叶的原料参数进行相关性分析，结果如表 4 所示。银杏内酯 A(Z_4)、银杏内酯 B(Z_5)、银杏内酯 C(Z_6) 和白果内酯（Z_7）含量之间的相关性系数高于 0.90，这说明这 4 个原料参数变化趋势类似。考虑到银杏内酯 C(Z_6) 含量较其他内酯含量高，所以在这 4 项中选择银杏内酯 C 含量（Z_6）作为潜在的银杏叶关键原料参数。山柰酚含量（Z_2）和没食子酸含量（Z_8）分别与 6- 羟基犬尿喹啉酸含量（Z_{10}）的相关性系数高于 0.90，考虑到对照品价格，

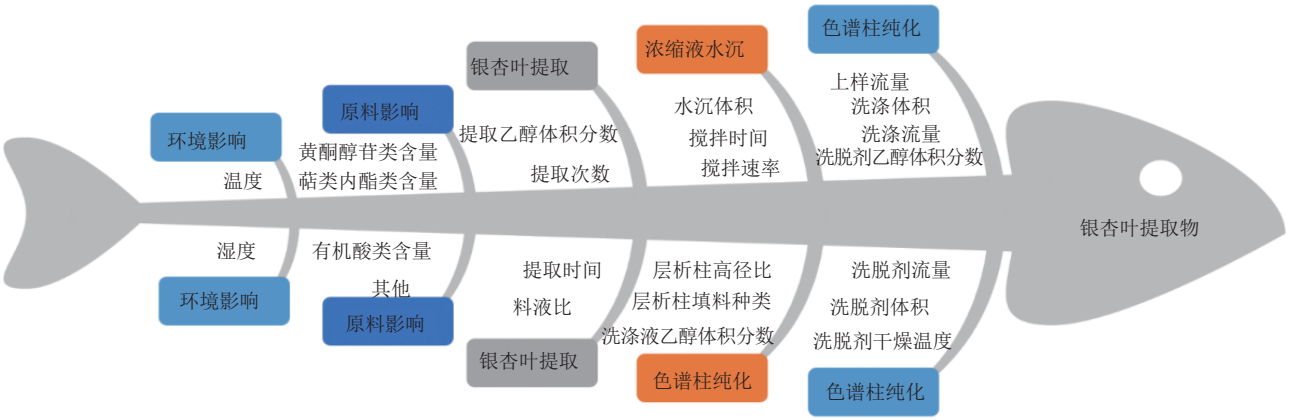


图 3 银杏叶提取物制备过程的鱼骨图分析

Fig.3 Ishikawa Diagram Analysis of *Ginkgo biloba* Extract Preparation Process

选择将没食子酸纳入模型。其他的潜在关键原料参数为槲皮素含量（Z_1）、原儿茶酸含量（Z_9）、对羟基苯甲酸含量（Z_{11}）和浸出物含量（Z_{12}）。

2.7 关键原料参数与关键工艺参数的确定

根据式③建立工艺评价指标和原料参数及工艺参数的定量模型，结果如表 5 所示。各模型的显著

表 3　8 批银杏叶原料参数的检测结果 [1)]/%

Tab.3　Test Results of Raw Material Parameters of Eight Batches of *Ginkgo biloba* Leaf/%

银杏叶编号	Z_1 含量	Z_2 含量	Z_3 含量	Z_4 含量	Z_5 含量	Z_6 含量	Z_7 含量	Z_8 含量	Z_9 含量	Z_{10} 含量	Z_{11} 含量	Z_{12} 含量
M1	0.994	1.256	0.656	0.021	0.008	0.243	0.021	0.313	0.457	0.525	0.273	23.340
M2	1.017	1.056	0.531	0.023	0.010	0.260	0.023	0.157	0.849	0.239	0.178	19.685
M3	1.014	0.836	1.439	0.008	0.003	0.069	0.004	0.109	1.623	0.196	0.188	23.708
M4	1.108	1.159	0.802	0.006	0.003	0.078	0.005	0.136	0.513	0.291	0.323	24.844
M5	1.048	1.366	0.630	0.018	0.009	0.210	0.014	0.226	0.283	0.585	0.200	24.272
M6	1.574	1.462	0.709	0.016	0.006	0.123	0.010	0.230	0.385	0.490	0.240	24.079
M7	0.928	1.097	0.515	0.016	0.008	0.243	0.015	0.169	0.483	0.335	0.211	21.714
M8	2.110	0.833	0.044	0	0	0.001	0	0.008	0.417	0.076	0.094	18.770

注：[1)] Z_1 ～ Z_{12} 分别表示槲皮素、山柰酚、异鼠李素、银杏内酯 A、银杏内酯 B、银杏内酯 C、白果内酯、没食子酸、原儿茶酸、6- 羟基犬尿喹啉酸、对羟基苯甲酸和浸出物。

表 4　基于原料参数相关性分析所得 Pearson 相关系数

Tab.4　Pearson Correlation Coefficients Obtained from Correlation Analysis of Raw Material Parameters

参数	Z_1	Z_2	Z_3	Z_4	Z_5	Z_6	Z_7	Z_8	Z_9	Z_{10}	Z_{11}	Z_{12}
Z_1	1.00											
Z_2	− 0.20	1.00										
Z_3	− 0.57	− 0.03	1.00									
Z_4	− 0.62	0.60	0.04	1.00								
Z_5	− 0.67	0.60	0.00	0.97	1.00							
Z_6	− 0.70	0.46	− 0.05	0.95	0.97	1.00						
Z_7	− 0.61	0.45	− 0.07	0.97	0.94	0.96	1.00					
Z_8	− 0.55	0.80	0.20	0.81	0.77	0.72	0.74	1.00				
Z_9	− 0.30	− 0.62	0.75	− 0.17	− 0.24	− 0.20	− 0.17	− 0.30	1.00			
Z_{10}	− 0.41	0.91	0.12	0.68	0.70	0.58	0.55	0.91	− 0.47	1.00		
Z_{11}	− 0.55	0.57	0.41	0.28	0.28	0.25	0.24	0.62	− 0.15	0.53	1.00	
Z_{12}	− 0.46	0.58	0.67	0.12	0.15	0.03	− 0.03	0.56	0.01	0.65	0.78	1.00

表 5　多元线性回归模型的偏回归系数及方差分析

Tab.5　The Standard Partial Regression Coefficients and Variance Analysis of the Multiple Linear Regression Models

模型项目	Y_1		Y_2		Y_3		Y_4	
	系数	P 值	系数	P 值	系数	P 值	系数	P 值
常量	1.82	—	10.72	—	0.61	—	− 2.800	—
Z_3	—	—	2 053.21	<0.000 1	—	—	—	—
Z_6	—	—	—	—	1 212.95	<0.000 1	813.613 8	0.003 0
Z_9	—	—	—	—	− 96.816 2	0.032 9	—	—
X_1	—	—	—	—	—	—	0.027 3	0.038 4
X_4	—	—	− 3.137 0	0.000 7	− 0.370 3	0.001 0	− 0.443 9	0.001 6
X_7	—	—	0.666 2	0.000 4	—	—	—	—
X_8	− 0.024 8	<0.000 1	7.960 9	0.029 4	0.068 4	0.002 0	0.081 2	0.003 7
X_{11}	− 0.207 0	<0.000 1	—	—	—	—	0.979 0	0.000 5
R^2	0.629 9 0.607 5		0.686 4		0.683 4		0.616 0	
R_{adj}^2	0.645 9		0.641 2		0.552 1			
模型 P 值	<0.000 1		<0.000 1		<0.000 1		<0.000 1	

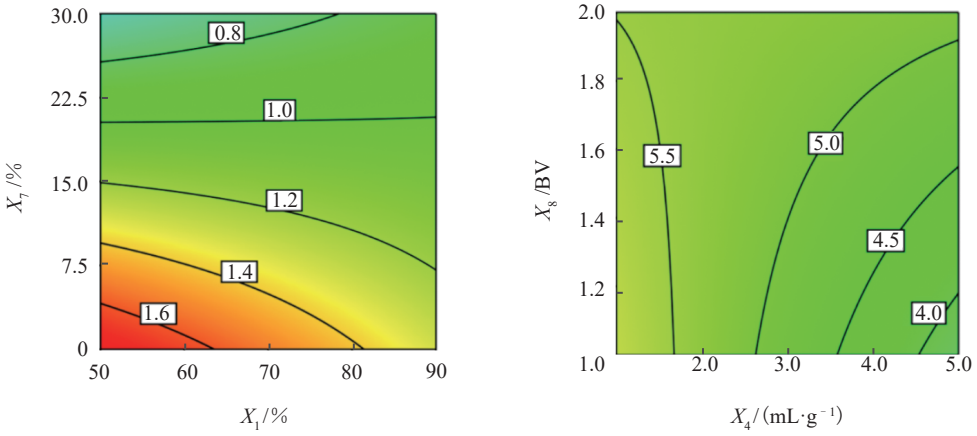
水平 P<0.000 1，说明模型显著。根据逐步回归后模型中剩余的项，确定异鼠李素（Z_3）含量、银杏内酯C（Z_6）含量和原儿茶酸（Z_9）含量是银杏叶提取物制备时的关键原料参数，恰好对应于黄酮醇苷类、萜类内酯类和有机酸类成分。确定的关键工艺参数为提取乙醇体积分数（X_1）、水沉体积（X_4）、洗涤乙醇体积分数（X_7）、洗涤液体积（X_8）和洗脱剂体积（X_{11}）。

2.8 关键参数的影响

根据公式④建立了各工艺评价指标与关键原料参数、关键工艺参数的定量数学模型，各模型的回归系数和方差分析结果如表 6 所示。各模型 P 值均小于 0.05，说明模型显著；决定系数 R^2 均大于 0.80，说明模型能解释大部分变异。图 4 ～ 7 为关键工艺参数对各个工艺评价指标影响的等高线图。从图 4、5 可知，银杏叶提取物的干物质含量随着提取乙醇体积分数（X_1）、洗涤乙醇体积分数（X_7）的增加而降低。随着提取乙醇体积分数（X_1）的升高，总黄酮醇苷含量（Y_2）先上升后下降；总萜类内酯含量（Y_3）则是先下降再上升。

2.9 设计空间的建立及验证

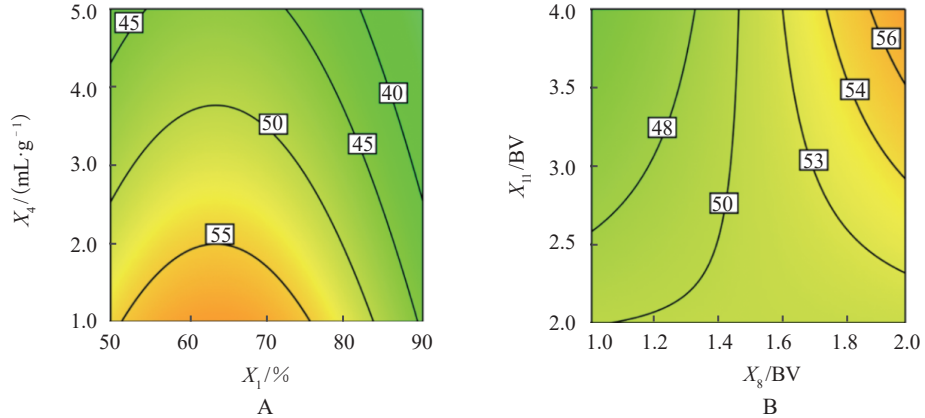
干物质含量的上限值和总有机酸含量的下限值取试验数据中位数，分别设定为 6.63 mg、g 和 3.19%；



A—X_4=1 mL/g，X_8=2 BV，X_{11}=2 BV；B—X_1=70%，X_7=30%，X_{11}=2 BV。

图 4 干物质含量的等高线图

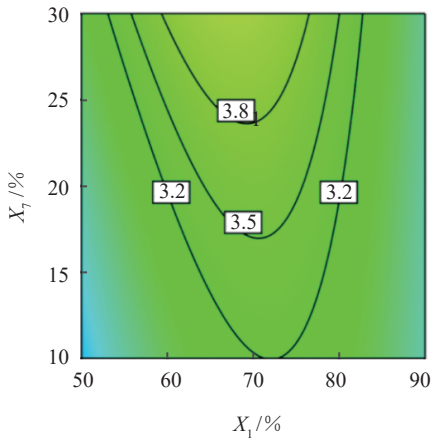
Fig.4 Contour Maps of Dry Matter Content



A—X_7=30%，X_8=2 BV，X_{11}=4 BV；B—X_1=70%，X_4=1 mL/g，X_7=30%。

图 5 总黄酮醇苷含量的等高线图

Fig.5 Contour Maps of Total Flavonol Glycoside Content



X_4=1 mL/g；X_8=2 BV；X_{11}=4 BV。

图 6　总萜类内酯含量的等高线图

Fig.6　Contour Map of Total Terpenoid Lactone Content

总黄酮醇苷含量和总萜类内酯含量根据 ChP 2020 年版规定，下限值分别设定为 24%和 6%；基于此所得的设计空间如图 8 所示，其中蓝色区域的风险值低。由于所得空间形状并不规则，为方便实际操作，推荐各关键工艺参数的操作范围为：提取乙醇体积分数为 65%～80%，水沉体积为 1.0～2.8 mL/g，洗涤乙醇体积分数为25%～28%，洗涤体积1.0～1.8 BV，洗脱体积为 2.5～4.0 BV。

在设计空间内、外分别选取 1 点进行验证试验，见图 8E 和图 8F。每个验证点做 3 次平行试验，验证试验条件及结果如表 7、8 所示。由表 8 可知，干物质含量、总黄酮醇苷含量、总萜类内酯含量、总有机酸含量的实测值与预测值结果相接近，提示模型的预测性能较好。设计空间内试验点的工艺评价指标均符合设计空间对指标的要

表 7　验证试验点条件

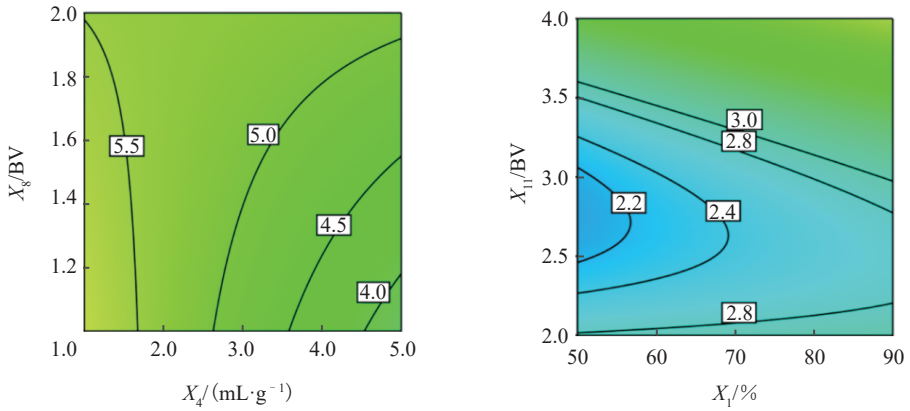
Tab.7　Conditions of Verification Experiment Points

试验条件是否在设计空间内	设计空间内验证点	设计空间外验证点
	是	否
银杏叶编号	M1	M7
提取乙醇体积分数 /%	70	90
水沉体积 /(mL·g^{-1})	1	5
洗涤液乙醇体积分数 /%	25	10
洗涤体积 /BV	2	1
洗脱体积 /BV	3.5	4

表 6　多元回归模型的方差分析结果

Tab.6　Results of Variance Analysis of Multiple Regression Models

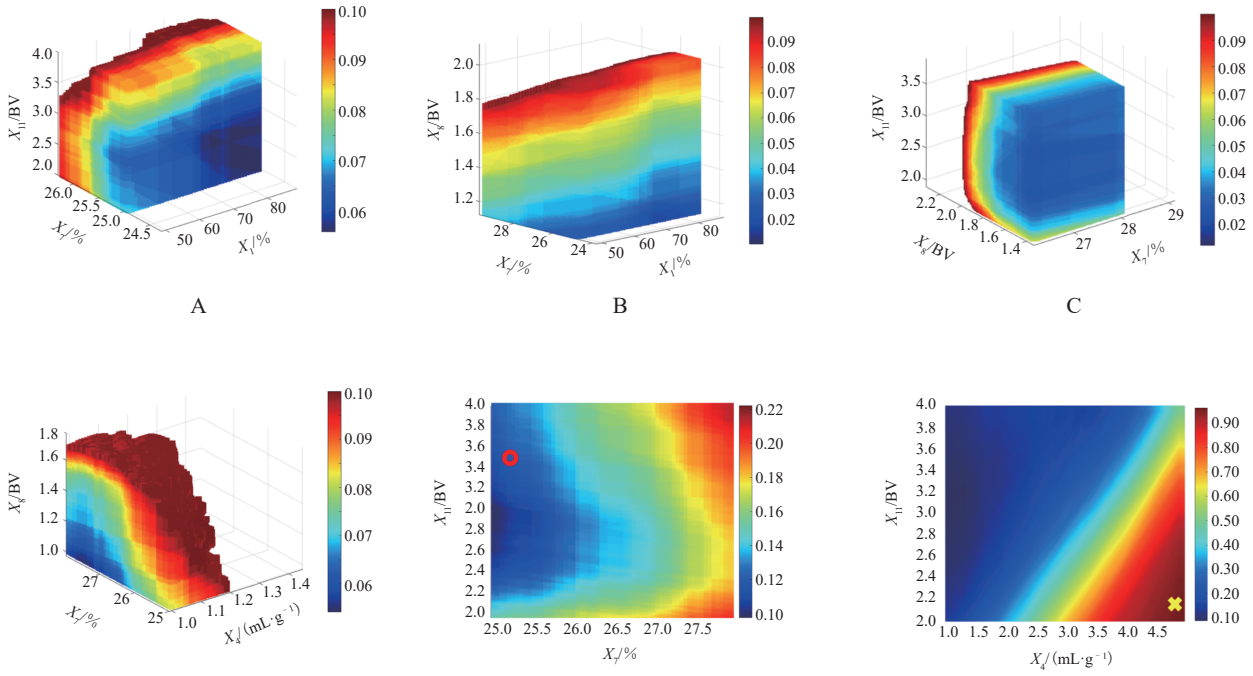
模型项目	Y_1		Y_2		Y_3		Y_4	
	系数	P 值	系数	P 值	系数	P 值	系数	P 值
常量	1.40	—	－18.965 8	—	－0.245 0	—	2.233 9	—
Z_3	—	—	903.873 7	0.019 3	—	—	—	—
Z_4	—	—	1 139.201 9	0.003 3	109 5.817 1	<0.000 1	933.834 0	<0.000 1
Z_7	—	—	—	—	－75.432 5	0.009 8	－106.077 6	0.006 3
X_1	—	—	—	—	—	—	0.093 0	0.001 8
X_4	0.233 8	0.011 6	16.232 8	<0.000 1	－0.051 9	0.000 3	0.399 3	<0.000 1
X_7	－0.149 9	<0.000 1	1.603 0	<0.000 1	0.109 9	0.030 6	0.037 9	<0.000 1
X_8	－0.168 9	0.008 8	3.164 4	0.001 3	—	—	0.807 9	0.016 2
X_{11}	－0.088 6	<0.000 1	—	—	—	—	－7.467 0	<0.000 1
X_1X_7	—	—	－0.013 3	0.000 2	－0.001 095	0.003 7	－0.003 3	0.000 4
X_1X_8	0.000 022	0.000 4	－0.012 9	0.017 8	—	—	—	—
X_4X_8	－0.003 4	0.077 6	—	—	—	—	—	—
X_4X_{11}	－0.043 3	0.003 8	—	—	—	—	－0.287 8	0.002 2
X_8X_{11}	—	—	1.719 3	0.000 8	—	—	—	—
X_{12}	—	—	—	—	0.000 188	<0.000 1	—	—
X_4^2	—	—	－3.196 0	0.016 4	－0.037 8	0.004 2	—	—
X_{11}^2	—	—	—	—	—	—	1.549 4	0.000 2
R^2	0.873 1		0.906 9		0.849 7		0.886 2	
R^2_{adj}	0.840 2		0.872 0		0.809 2		0.840 7	
模型 P 值	<0.000 1		<0.000 1		<0.000 1		<0.000 1	



A—X_1=70%，X_7=30%，X_{11}=2 BV；B—X_4=1 mL/g，X_7=30%，X_8=2 BV。

图 7 总有机酸含量的等高线图

Fig.7 Contour Maps of Total Organic Acid Content



A—银杏叶编号 M1，X_4=1 mL/g，X_8=2 BV；B—银杏叶编号 M1，X_4=1 mL/g，X_{11}=4 BV；C—银杏叶编号 M1，X_1=90%，X_4=1 mL/g；D—银杏叶编号 M1，X_1=90%，X_{11}=4 BV；E—银杏叶编号 M1，X_1=70%，X_4=1 mL/g，X_8=2 BV；F—银杏叶编号 M7，X_1=90%，X_7=10%，X_8=1 BV。

（彩条代表达标概率；○ 表示设计空间内部的验证点，× 表示设计空间外部的验证点）

图 8 设计空间及验证点

Fig.8 Design Space and Verification Points

求限值，设计空间外试验点的工艺评价指标均不能达标。这说明建立的设计空间可靠，在设计空间内进行操作时，能够保证干物质含量与各成分含量均在规定限值内。

3 讨论

本研究在考虑不同批次银杏叶质量差异的条件

表 8　验证试验点结果

Tab.8　Results of Verification Experiment Points

工艺指标是否在设计空间内	实测 / 预测值	设计空间内验证点 是	设计空间外验证点 否
干物质含量 /(mg·g^{-1})	实测值 [1)]	3.15±0.17	7.40±0.019
	预测值	3.89	7.79
总黄酮醇苷含量 /%	实测值 [1)]	48.58±2.01	15.87±1.18
	预测值	54.10	17.39
总萜类内酯含量 /%	实测值 [1)]	6.63±0.41	1.82±0.09
	预测值	6.25	1.43
总有机酸含量 /%	实测值 [1)]	7.39±0.35	3.18±0.16
	预测值	6.49	2.75

注：[1)] 实测值为平均值 ±SD（n=3）。

下，采用确定性筛选试验设计方法优化了银杏叶提取物制备工艺。发现关键原料参数包括异鼠李素、银杏内酯 C 和原儿茶酸含量，关键工艺参数为提取乙醇体积分数、水沉体积、洗涤液乙醇体积分数、洗涤液体积和洗脱体积。建立了设计空间，推荐工艺参数范围为：乙醇体积分数 65%～80%，水沉体积 1.0 ～ 2.8 mL/g，洗涤液乙醇体积分数为 25%～28%，洗涤体积为 1.0 ～ 1.8 BV，洗脱体积为 2.5 ～ 4.0 BV。最佳提取次数为 2 次，减压干燥温度 55 ℃。验证试验中总黄酮醇苷、总萜类内酯和总有机酸含量分别达 48.58%、6.63%和 7.39%。

ChP 2020 年版一部中收录的中药提取物及中成药“制法”项规定了生产工艺流程，但是没有规定工艺参数取值，所以普遍存在企业生产中具体参数未经过系统优化的情况。本研究的特色是优化工艺参数时考虑了药材在批次间的质量差异，优化所得工艺参数能适用于研究范围内的药材质量波动，有利于提升工艺抗干扰能力，获得批间一致性更好的提取物。此外，所得银杏叶提取物符合 ChP 2020 年版的要求，而且具有较高有机酸含量。因此，本研究所用参数优化方法有望获得适用于批间质量波动药材的稳健参数范围，具有较好的推广应用前景，能为工业生产提供更为精准、高效的工艺指导。

参考文献：

[1] 肖斯婷，曹春然，刘红艳，等. 银杏叶提取物的药学研究进展 [J]. 中国药事，2022, **36**(4): 429-443.

[2] ZHANG S J, GONG X C, QU H B. A simple and effective method for the preparation of high-purity shikimic acid from chromatography wash effluent of *Ginkgo biloba* leaf extract by macroporous resin considering the effect of varying feed solution compositions [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2021, **73**(4): 447-459.

[3] 杨洪欣，商宇铠，闫启东，等. 银杏叶中活性物质提取方法的研究进展 [J]. 化工时刊，2023, **37**(1): 42-46.

[4] 邹晓佩，邹慧慧，柯嘉洽，等. 银杏叶提取物神经保护作用研究进展 [J]. 现代中西医结合杂志，2023, **32**(10): 1451-1456.

[5] LI J H, LAN J, WANG S F, *et al*. Advances on analysis methods of *Ginkgo biloba* leaf extract [J]. *J Liq Chromatogr*, 2023, **46**(6-10): 138-152.

[6] ZHANG S J, GONG X C, QU H B. Near-infrared spectroscopy and HPLC combined with chemometrics for comprehensive evaluation of six organic acids in *Ginkgo biloba* leaf extract [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2022, **74**(7): 45-46.

[7] LI J C, CHEN Z X, SHI H M, *et al*. Ultrasound-assisted extraction and properties of polysaccharide from *Ginkgo biloba* leaves [J]. *Ultrason Sonochem*, 2023, **93**: 106295-106295.

[8] 金婕妤，王丹丹，高　崎. 银杏叶中聚戊烯醇提取和分离纯化工艺概述 [J]. 中国医药工业杂志，2020, **51**(5): 572-578.

[9] 冯　靖. 银杏叶黄酮的提取纯化工艺研究 [D]. 北京：北京石油化工学院硕士学位论文，2019.

[10] 毕艳艳，马庆文，许　辉，等. Box-Behnken Design 响应面法优化银杏叶总黄酮柱色谱纯化工艺 [J]. 山东科学，2022, **35**(6): 8-15.

[11] ABOUHEIF S A, SALLAM S M, EL S S M, *et al*. Optimization of terpene lactones and ginkgolic acids extraction from *Ginkgo biloba* L. leaves by natural deep eutectic solvents using experimental design and HPTLC-MS analysis [J]. *Microchem J*, 2022, **176**: 107246.

[12] 龚行楚，汪清琳，程翼宇. 中药制药过程质量控制方法探索——以三七总皂苷生产制造为例 [J]. 中国食品药品监管，2022, (10): 54-63.

[13] 钟　文，陈　莎，章　军，等. 重点是原料，还是工艺？——以葛根芩连汤为例探讨中成药质量一致性控制方法 [J]. 中国中药杂志，2016, **41**(6): 1027-1032.

[14] PAN J J, HE S Y, ZHENG J Y, *et al*. The development of an herbal material quality control strategy considering the effects of manufacturing processes [J]. *Chinese Med*, 2019, **14**(1): 38.

（下转第 395 页）

Chromatogr Sci, 2010, **48**(9): 704-713.

[4] MATTA M K, BURUGULA L, PILLI N R, *et al*. A novel LC-MS/MS method for simultaneous quantification of tenofovir and lamivudine in human plasma and its application to a pharmacokinetic study [J]. *Biomed Chromatogr*, 2012, **26**(10): 1202-1209.

[5] 董艳飞, 钟 兵, 刘 冰. 富马酸丙酚替诺福韦片治疗慢性乙型肝炎合并脂肪肝的临床疗效及安全性 [J]. 临床合理用药, 2024, **17**(23): 69-73.

[6] 贾 玲, 娄宪芝, 那 妍. 血清前白蛋白总胆红素比值水平评估慢性乙型肝炎恩曲他滨治疗耐药性的价值 [J]. 中国药物经济学, 2020, **15**(3): 59-62.

[7] YADAV M, SINGHAL P, GOSWAMI S, *et al*. Selective determination of antiretroviral agents tenofovir, emtricitabine, and lamivudine in human plasma by a LC-MS-MS method for a bioequivalence study in healthy Indian subjects [J]. *J Chromatogr Sci*, 2010, **48**(9): 704-713.

[8] 张晞倩, 张军东, 赵 萍, 等. 空腹及餐后口服富马酸替诺福韦二吡呋酯片的人体生物等效性 [J]. 中国医药工业杂志, 2015, **46**(2): 180-185.

[9] 龙友琦, 尚京川, 颜 波, 等. 中国西部健康人群口服恩曲他滨胶囊的药动学 [J]. 中国医院药学杂志, 2013, **33**(1): 11-14.

[10] 陈枳漙, 冯仕银, 南 峰, 等. LC-MS/MS 法测定人血浆中替诺福韦质量浓度及其生物等效性研究 [J]. 四川大学学报 (医学版), 2018, **49**(1): 107-112.

(上接第 388 页)

[15] REN D D, XIANG S S, YAN Y W, *et al*. Design and optimization of purification process of sinomenine hydrochloride [J]. *Chin J Chem Eng*, 2023, **55**(3): 63-72.

[16] 石福娟, 杨超杰, 陈秀芬, 等. 产地、树龄、采收期等因素对银杏叶中黄酮和萜内酯含量的影响 [J]. 中国中药杂志, 2022, **47**(15): 4055-4065.

[17] 殷海利, 赵一懿, 郭洪祝, 等. 银杏叶中 6 种有机酸类成分定量分析 [J]. 中国新药杂志, 2019, **28**(12): 1505-1510.

[18] 李今豪. 银杏叶提取物工艺中间体检测方法及制备工艺研究 [D]. 天津: 天津中医药大学硕士学位论文, 2024.

[19] 李今豪, 周雅青, 颉佳乐, 等. 基于分析质量源于设计的银杏叶提取液中有机酸含量分析方法 [J]. 分析测试学报, 2024, **43**(11): 1735-1744.

[20] 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.

[21] SHAO J Y, CAO W, QU H B, *et al*. A novel quality by design approach for developing an HPLC method to analyze herbal extracts: a case study of sugar content analysis [J]. *Plos One*, 2018, **13**(6): 198515.

[22] CHEN T, GONG X C, ZHANG Y, *et al*. Optimization of a chromatographic process for the purification of saponins in *Panax notoginseng* extract using a design space approach [J]. *Sep Purif Technol*, 2015, **154**: 309-319.

[23] GONG X C, CHEN H L, PAN J Y, *et al*. Optimization of *Panax notoginseng* extraction process using a design space approach [J]. *Sep Purif Technol*, 2015, **141**: 197-206.

[24] JIANG C, GONG X C, QU H B. A strategy for adjusting macroporous resin column chromatographic process parameters based on raw material variation [J]. *Sep Purif Technol*, 2013, **116**: 287-293.