

响应面法优化柴银颗粒的水煎煮工艺

戚兴会^{1,2}, 张翠云^{1,2}, 李艳^{1,2}, 王立友^{1,2}, 王永刚^{1,2}, 关永霞^{1,2*}

1. 鲁南厚普制药有限公司, 山东 临沂 276006

2. 鲁南制药集团股份有限公司 中药制药共性技术国家重点实验室, 山东 临沂 276006

摘要 目的 优化柴银颗粒的水煎煮工艺。方法 以出膏率、连翘苷转移率为考察指标, 以加水量、煎煮次数和煎煮时间为考察因素, 在单因素试验基础上运用 Box-Behnken 响应面法进行优化, 确定最佳工艺条件, 并进行验证。结果 优化后的工艺为煎煮3次, 每次加水11倍量, 煎煮1.5 h。结论 Box-Behnken 响应面优化的煎煮工艺可用于柴银颗粒的提取。

关键词: 柴银颗粒; 煎煮工艺; Box-Behnken 响应面法; 优化

中图分类号: R284.2 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2021)11-2255-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2021.11.006

Optimization of water extraction process of Chaiyin Granules by Box-Behnken response surface method

QI Xing-hui^{1,2}, ZHANG Cui-yun^{1,2}, LI Yan^{1,2}, WANG Li-you^{1,2}, WANG Yong-gang^{1,2}, GUAN Yong-xia^{1,2}

1. Lunan Hope Pharmaceutical Co., Ltd., Linyi 276006, China

2. State Key Laboratory of Generic Manufacture Technology of Traditional Chinese Medicine, Lunan Pharmaceutical Group Co., Ltd., Linyi 276006, China

Abstract: Objective To optimize the extraction technology of Chaiyin Granules. **Methods** Taking paste rates and transfer rate of forsythoside as index, volume fractions of water, extraction times, and extraction time as factors, based on single factor experiment, Box-Behnken design-response surface method was used to optimize the extraction technology of Chaiyin Granules. The verification tests were carried out on the optimized extraction technology. **Results** The optimal extraction technology included that 11 times of water, 3 extraction times, and extracting for 1.5 h each time. **Conclusion** Box-Behnken response surface methodology can be used to optimize the extraction technology of Chaiyin Granules.

Key words: Chaiyin Granules; extraction technology; Box-Behnken response surface method; optimization

柴银颗粒是由柴胡、黄芩、金银花、连翘、鱼腥草、葛根、荆芥、薄荷、青蒿、苦杏仁、桔梗等提取加工制成的中药复方制剂, 具有抗炎、清热解毒、利咽止咳的功效, 可用于治疗流行性感、上呼吸道感染等^[1]。柴银颗粒还可通过调节机体免疫功能治疗人冠状病毒肺炎^[2-3]。响应面法是一种优化多变量系统的统计方法, 能在给出的整个区域找到因素和响应值之间明确的函数表达式, 找到整个区域中因素的最佳组合和响应的最优值, 得到最佳的工艺参数, 已被广泛应用于中药的提取、纯化和工艺优化^[4-6]。柴银颗粒组方提取原工艺为: 柴胡、荆

芥、金银花、青蒿、连翘、薄荷、鱼腥草、黄芩、葛根、桔梗加水13倍量, 煎煮2次, 每次2h, 生产耗时较长, 出膏率(36%)、连翘苷转移率(85%)较低。煎煮工艺也对药物疗效有一定的影响^[7]。因此为提高生产效率、降低生产成本、保证药品的质量, 本实验采用响应面法优化柴银颗粒组方药材的煎煮工艺, 考察加水量、煎煮时间、煎煮次数的影响, 以出膏率、连翘苷转移率的综合评分为衡量指标, 探讨柴银颗粒组方药材的水煎煮提取工艺。

1 仪器与试剂

Waters e2695 型高效液相色谱仪; R2002 型旋

收稿日期: 2021-08-09

基金项目: 山东省重点研发计划(重大科技创新工程)项目(2020CXGC010505)

作者简介: 戚兴会(1990—), 女, 硕士, 研究方向为新药研发与工艺优化。E-mail: 18306562737@163.com

*通信作者: 关永霞(1980—), 女, 高级工程师, 硕士, 研究方向为中药新药开发与制药共性技术研究。E-mail: jmsgyx@163.com

转蒸发器(上海申顺生物科技有限公司); XS204 型电子分析天平(Mettler Toledo 公司)。连翘苷对照品(中国食品药品检定研究院, 批号 110821-201816); 乙腈为色谱纯, 水为纯化水, 其余试剂均为分析纯。柴银颗粒处方组成的药材均由安徽人民中药饮片有限公司、山东百味堂中药饮片有限公司提供, 经中药制药共性技术国家重点实验室范建伟高级工程师鉴定, 符合《中国药典》2020 年版一部相关规定。

2 方法与结果

2.1 出膏率的测定

精密吸取相当于 2 g 原药材量提取液(0.9 mL), 置已干燥至恒定质量(W_1)的蒸发皿中, 于 105 °C 热风循环干燥箱中干燥, 放至室温后精密称质量(W_2), 计算出膏率。

$$\text{出膏率} = (W_2 - W_1) / 2$$

2.2 连翘苷转移率的测定

连翘苷测定方法参考《中国药典》2020 年版一部连翘项下 HPLC 法测定连翘苷^[8]。色谱条件: Waters Cortecs C₁₈ 色谱柱(50 mm×4.6 mm, 2.7 μm), 以乙腈-水(30:70)为流动相, 检测波长 277 nm, 柱温 30 °C, 体积流量 1 mL/min。理论板数按连翘苷峰计不低于 3 000。计算连翘苷转移率。

连翘苷转移率 = (连翘苷质量浓度×提取液量) / (药材中的质量分数×药材质量)

2.3 单因素考察试验

2.3.1 加水量的筛选 准确称取药材(柴胡 62.5 g, 荆芥 31.5 g, 金银花、青蒿、连翘、薄荷、鱼腥草各 47 g), 置不锈钢桶中, 饮用水浸泡 1 h, 加热提取挥发油 2.5 h 后, 在煎煮时间为 2 h 和煎煮次数为 2 次的条件下, 考察不同加水量(7、10、13、16 倍量)对出膏率和连翘苷转移率的影响; 合并滤液后回收溶剂, 得稠膏, 计算出膏率、连翘苷转移率, 结果见表 1。可见随着加水量的增大, 出膏率逐渐增加, 连翘苷转移率先增大后略微下降。因此, 选择加水量为 7~13 倍量进行后续 Box-Behnken 响应面优化, 且以加水量 10 倍量为固定水平值。

2.3.2 煎煮时间的筛选 在加水量为 7 倍量和煎煮次数为 2 次的条件下, 考察不同煎煮时间(1、1.5、2、3 h)对出膏率和连翘苷转移率的影响, 结果见表 2。可见随着煎煮时间的增加, 出膏率逐渐增加, 但连翘苷转移率先增大后下降。因此, 选择煎煮时间为 1~2 h 进行后续 Box-Behnken 响应面优化,

且以煎煮时间 1.5 h 为固定水平值。

表 1 加水倍量对提取结果的影响

Table 1 Effect of water addition on extraction

加水倍量	出膏率/%	连翘苷转移率/%
7	28.14	65.36
10	32.97	88.63
13	37.16	86.29
16	38.23	84.27

表 2 煎煮时间对提取结果的影响

Table 2 Effect of decocting time on extraction

煎煮时间/h	出膏率/%	连翘苷转移率/%
1	20.75	64.86
1.5	28.24	75.33
2	29.97	74.63
3	32.53	70.27

2.3.3 煎煮次数的筛选 在煎煮时间为 2 h 和每次加水量为 10 倍量的条件下, 考察不同煎煮次数(1、2、3、4、5 次)对出膏率、连翘苷转移率的影响, 结果见表 3。可见出膏率随提取次数的增加依次增大, 但当提取次数大于 3 时, 连翘苷转移率缓慢下降。浸提次数过多, 会增加成本、影响提取效果, 故选择煎煮次数为 2~4 次进行后续 Box-Behnken 响应面优化, 且以煎煮次数 3 次为固定水平值。

表 3 煎煮次数对提取结果的影响

Table 3 Effect of decocting times on extraction

煎煮次数	出膏率/%	连翘苷转移率/%
1	20.35	60.86
2	31.24	86.33
3	40.97	91.63
4	43.48	90.26
5	49.23	87.27

2.4 响应面优化水煎煮提取工艺

2.4.1 响应面优化试验设计和结果 响应曲面分析法是运用数学统计的方法, 将不同因素间的交互作用和经验、技术以函数模型、图形等方式输出的一门综合试验技术, 便于筛选最佳工艺条件, 广泛应用于工艺优化的研究^[9]。

本研究以单因素试验结果为基础, 根据 Box-Behnken Design 中心组合设计原理, 以加水倍量(A)、煎煮时间(B)、煎煮次数(C)为考察因素, 以出膏率(Y_1)、连翘苷转移率(Y_2)的综合评分(R)

为响应值 ($R = Y_1/Y_{1\max} \times 40 + Y_2/Y_{2\max} \times 60$), 利用 Design-Expert v10.0.7 软件进行三因素三水平试验, 优化柴银颗粒的水煎煮工艺。Box-Behnken 响应面的因素水平设计和结果见表 4, 响应面二次回归方程方差结果分析见表 5。

表 4 Box-Behnke 试验设计和结果

试验号	A/倍	B/h	C/次	$Y_1/\%$	$Y_2/\%$	R
1	10	2	4	39.15	82.40	84.89
2	10	1.5	3	46.23	96.72	99.88
3	10	1.5	3	44.03	96.18	97.65
4	13	1.5	4	38.68	77.24	81.29
5	10	1.5	3	46.12	96.84	99.86
6	10	2	2	32.97	88.63	83.41
7	13	2	3	37.75	87.29	86.71
8	10	1.5	3	46.28	94.96	98.84
9	7	1	3	26.56	76.78	70.53
10	10	1	2	30.75	84.86	79.15
11	7	2	3	29.96	84.85	78.47
12	10	1	4	35.52	88.96	85.82
13	7	1.5	4	34.85	78.84	78.97
14	13	1	3	36.57	92.87	89.15
15	13	1.5	2	36.88	91.63	88.65
16	7	1.5	2	28.63	72.36	69.58
17	10	1.5	3	45.23	95.93	98.53

表 5 方差分析结果

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	1 534.14	9	170.46	94.96	<0.000 1
A	290.98	1	290.98	162.10	<0.000 1
B	9.75	1	9.75	5.43	0.052 6
C	12.97	1	12.97	7.22	0.031 2
AB	26.95	1	26.95	15.01	0.006 1
AC	70.08	1	70.08	39.04	0.000 4
BC	6.74	1	6.74	3.75	0.093 9
A ²	483.54	1	483.54	269.36	<0.000 1
B ²	207.53	1	207.53	115.61	<0.000 1
C ²	312.39	1	312.39	174.02	<0.000 1
残差	12.57	7	1.80		
失拟项	8.99	3	3.00	3.35	0.136 5
纯误差	3.58	4	0.89		
总变异	1 546.70	16			

利用 Design-Expert v10.0.7 软件对试验数据进行二次多元回归拟合, R 对各因素的二次多项回归

模型方程为 $R = -267.56 + 32.61 X_A + 111.55 X_B + 70.80 X_C - 1.73 X_{AB} - 1.40 X_{AC} - 2.60 X_{BC} - 1.19 X_A^2 - 28.08 X_B^2 - 8.61 X_C^2$ 。回归模型的 $F = 117.49$, $P < 0.000 1$, $R^2 = 0.991 9$, 调整确定系数 $R^2_{\text{adj}} = 0.981 4$ (可解释 98.14% 相应值), 模型失拟项 $0.136 5 > 0.05$, 不显著, 拟合程度好, 说明单因素试验结果与数学模型模拟良好。一次项 A、二次项 AB、AC、A²、B²、C² 均达到极显著水平 ($P < 0.01$), BC 的影响差异无统计学意义。

离散系数 CV (Y 的变异系数) 表示试验的精确度, 其值越小, 试验的可靠性和精密密度越高。本实验 CV 值为 1.55%, 回归模型拟合程度良好, 试验误差小, 操作可信度高, 具有一定的实践指导意义。结合表 5 和回归模型可知, 单因素对 R 的显著性影响依次为 $A > C > B$ 。

2.4.2 多因素交互作用的响应曲面分析 等高线图呈椭圆状或马鞍形时, 表示两因素间的交互作用显著, 圆形则相反^[10-11]。柴银颗粒水煎煮法提取的 3 个因素间交互作用的响应面图见图 1。

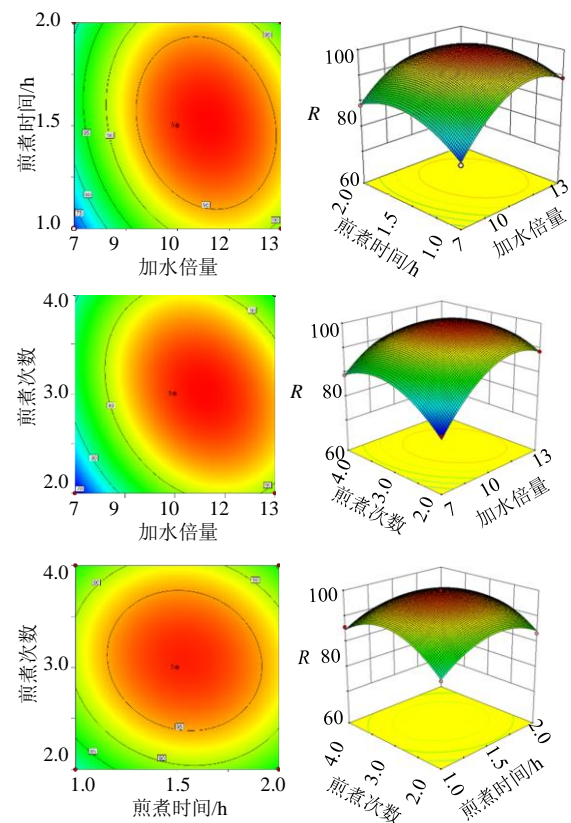


图 1 各因素对综合得分的等高线图和响应面

Fig. 1 Effect of factors on contour plot and response surface of the comprehensive scores

当煎煮时间一定时,随着加水倍量的增加, R 逐渐增加,当加水倍量超过 11 时, R 开始缓慢降低;当加水倍量一定时,随着煎煮时间增加, R 缓慢增加,当煎煮时间超过 1.5 h 时, R 缓慢降低。

当煎煮次数一定时,随着加水倍量的增加, R 逐渐增加,当加水倍量超过 11 倍时, R 略微降低;当加水倍量一定时,随着煎煮次数的增加, R 逐渐增加,当煎煮次数超过 3 次时, R 略微降低。

当煎煮时间一定时,随着煎煮次数的增加, R 缓慢增加,当提取次数超过 3 次时, R 略有降低;当煎煮次数一定时,随着煎煮时间的增加, R 逐渐增加,当煎煮时间超过 1.5 h 时, R 略有降低。

因此由等高线图可知,煎煮次数和煎煮时间交互作用的等高线图没有呈现明显的椭圆形,说明其交互作用不显著;加水倍量和煎煮时间、加水倍量和煎煮次数交互作用的等高线图呈现明显的椭圆形,说明其交互作用显著。

经 Design-Expert v10.0.7 软件优化得到的最优工艺条件:煎煮次数为 3.01 次、每次加水倍量为 11 倍、每次煎煮时间为 1.51 h。在此条件下,出膏率为 46.16%、连翘苷转移率为 96.69%。结合实际所需,最终确定提取工艺:煎煮次数 3 次、每次加水倍量为 11 倍、每次煎煮时间 1.5 h。

2.5 验证实验

准确称取组方药材(柴胡 62.5 g,荆芥 31.5 g,金银花、青蒿、连翘、薄荷、鱼腥草各 47 g),浸泡 1 h,加热提取挥发油 2.5 h 后,按优化的提取工艺进行 3 次验证实验,得到出膏率分别为 46.55%、46.54%、46.51%,平均值为 46.53%,RSD 值为 0.04%。连翘苷转移率分别为 96.18%、96.14%、96.13%,平均值为 96.15%,RSD 值为 0.03%,提示优化得到的提取工艺稳定可靠。生产原工艺:加水量 13 倍量,煎煮 2 次,每次 2 h,出膏率 37.75%、连翘苷转移率 87.29%。工艺优化前后对比可知:出膏率、连翘苷转移率分别提高 8.78%、8.86%。

3 讨论

本研究在单因素试验结果的基础上通过响应

面法对柴银颗粒中 7 味药材的水煎煮工艺进行优化,确定的最优提取工艺为:煎煮 3 次、每次加水 11 倍量、每次煎煮 1.5 h。为确保黄芩苷的含量、缩短批次间的生产周期,后 3 味药材原工艺提取,与前 7 味药材分煎,煎煮浓缩液合并进行后续制剂。该方法优化了柴银颗粒的水煎煮工艺,虽然总的加水倍量提高,但提取率增高、工艺稳定、重现性好,可用于柴银颗粒的提取。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 姜艳玲,孙成磊,宋毅,等.柴银口服液与奥司他韦治疗小儿上呼吸道感染疗效比较分析[J].世界中医药,2019,14(10):2679-2682.
- [2] 张贵民,张子成,关永霞,等.柴银制剂在制备抗冠状病毒药物中的应用[P].中国:CN111297969A,2020-06-19.
- [3] 孙元芳,李冰冰,关永霞,等.基于网络药理学和分子对接技术探讨柴银颗粒抗冠状病毒感染潜在分子机制[J].中草药,2020,51(19):4999-5009.
- [4] 彭晓霞,路莎莎.响应面优化法在中药研究中的应用和发展[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(19):296-298.
- [5] 胡道德,顾磊,姚慧娟,等.中药提取及优化的研究进展[J].医药导报,2009,28(1):80-82.
- [6] 刘蕾蕾,刘冬涵,张紫薇,等.Box-Behnken 响应面法优化芍药甘草汤的提取工艺[J].中南药学,2021,19(6):1113-1119.
- [7] 俱蓉,李响,朱向东,等.中药煮散的历史沿革、制备工艺及药效学研究进展[J].中国药房,2020,31(23):2924-2927.
- [8] 中国药典[S].三部.2020:178.
- [9] 文冉,吕青涛,李娜,等.基于综合加权评分-Box-Behnken 响应面法优化半枝莲的提取工艺[J].中药材,2020,43(5):1181-1185.
- [10] Bhaskaracharya R K, Kentish S, Ashokkumar M. Selected applications of ultrasonics in food processing [J]. *Food Eng Rev*, 2009, 1(1): 31-49.
- [11] 陶厚永,曹伟.多项式回归与响应面分析的原理及应用[J].统计与决策,2020(8):36-40.

[责任编辑 解学星]