

Box-Behnken 优化咳露口服液提取工艺

许海燕¹ 郑伶俐²

(1 陕西国际商贸学院医药学院, 咸阳, 712046; 2 步长集团咸阳制药厂, 咸阳, 7120003)

摘要 目的:利用响应面法(RSM)优化咳露口服液的提取工艺。方法:以处方中君药黄芩的主要成分黄芩苷为优化指标,在单因素试验基础上,选取提取时间、提取次数、料液比为自变量,以水为提取溶剂,黄芩苷含量为响应值,应用中心组合试验设计方法,研究各自变量及其交互作用对黄芩苷含量的影响,建立二次多项回归方程预测数学模型。结果:提取时间、提取次数、料液比3个因素对黄芩苷含量均有显著影响。确定咳露口服液提取的最佳工艺参数提取时间70 min,提取次数2次,料液比1:13,在此条件下,口服液中黄芩苷的含量为0.96 mg/mL。结论:响应面法可用于咳露口服液提取工艺的优化,该方法快速、简单、稳定,对口服液提取工艺优化有一定参考价值。

关键词 咳露口服液;响应曲面法;提取工艺;黄芩苷

Optimization of Extraction Process of Kelu Oral Liquid by Box-Behnken

Xu Haiyan¹, Zheng Lingli²

(1 Medical college, Shaanxi Institute of International Trade, Xi'an 712046, China;

2 Xi'an BuChang Medicine CO. LTD., Xi'an 712000, China)

Abstract Objective: Response surface methodology (RSM) was used to optimize the extraction process of Kelu oral liquid. **Methods:** Among the prescription, *Scutellaria Baicalensis* was the principal drug, and the main component, baicalin, was the index of quality control. Based on the single factor analysis, the extraction time, extraction frequency and solid-to-liquid ratio were independent variables, and the amount of baicalin was response value. The research center combined the design of the experiment, studied each independent variable and its interaction effect on the amount of baicalin and builded Second-degree polynomials equation mathematical model of prediction. **Results:** The extraction time, extraction frequency and solid-to-liquid ratio had all significant effects on the amount of baicalin. The optimal technology parameters extraction time of Kelu oral liquid was 70 min, the extraction times was 2 times, and solid-liquid ratio was 1:13. Under such conditions, the amount of baicalin was 0.96 mg/mL. **Conclusion:** Box-Behnken could be used for extraction optimization of extraction process for Kelu oral liquid, and the optimized technology was quick, simple and stable, besides, it had reference value for optimization of extraction of oral liquid.

Key Words Kelu Oral liquid; Response surface methodology; Extraction process; Baicalin

中图分类号:R284.2 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2016.11.059

咳露口服液处方由川贝母、枇杷叶、紫菀、麻黄、黄芩、罂粟壳、甘草、薄荷脑等8味中药组方而成^[1]。具有清热,宣肺,平喘,化痰止咳的功效,是治疗痰热咳嗽的常用中成药之一,广泛用于风热犯肺内郁化火所致的咳嗽痰多或吐痰不爽,咽喉肿痛,胸满气短,感冒咳嗽及慢性支气管炎等证^[2],临床应用广泛。通过药材性质、生产工艺条件、节约能源及有效成分最大限度的提取等因素的综合考虑,咳露口服液的提取选择了水提工艺。本实验为进一步优化该口服液的提取工艺,通过响应曲面法设计试验,以该口服液中君药黄芩中的主要成分黄芩苷含量为指标,对该口服液的提取工艺进行优化。

1 材料与方法

1.1 仪器 高效液相色谱仪(Waters2195,美国);电子天平 E-10d(赛多利斯科学仪器,北京有限公

司);MPT-1-10高纯水机(北京子涵公司);超声波清洗器 Q2200DB(昆山市超声仪器有限公司);旋转蒸发器 RE-52A(巩义市予华仪器有限责任公司);循环水式多用真空泵 SHB-III(郑州长城科工贸有限公司)。

1.2 试药 黄芩苷对照品(批号:140715 201416 鉴别或含量测定用,购于中国药品生物制品检定所);川贝母、枇杷叶、紫菀、麻黄、黄芩、罂粟壳、甘草、薄荷脑8味药材均为饮片,购自陕西省西安市万寿路药材批发市场,经陕西国际商贸学院生药教研室雷国莲教授鉴定均为正品。所用试剂乙腈为色谱纯,其余均为分析纯。

1.3 黄芩苷的含量测定

1.3.1 口服液制备方法^[3] 按处方量取上述八味药材,除去薄荷脑外,取麻黄,用水蒸气蒸馏,其药液

及蒸馏液收集备用;药渣混合其余几味药材,加水煎煮,煎煮液合并,过滤,滤液与麻黄蒸馏液及药液合并,浓缩至相对密度为 1.10 ~ 1.15 (50 ℃),加入薄荷脑,定容至 1 000 mL,即得。

1.3.2 色谱条件^[4-7] Waters2195 型高效液相色谱仪;色谱柱:以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂;流动相:乙腈-0.6% 磷酸水溶液(45:60);检测波长 210 nm;流速 1.0 mL/min;柱温:25 ℃;进样量 15 μL;理论板数按黄芩苷峰计算应不低于 2 000。

1.3.3 对照品溶液制备 精密称取黄芩苷对照品 2.5 mg 置于 25 mL 容量瓶中,加甲醇溶解至刻度,摇匀,静置,过滤,取续滤液,即得。

1.3.4 供试品溶液的制备 精密吸取上述制备好的口服液 10 mL 置于 100 mL 容量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀,静置,过滤,取续滤液,即得。

1.3.5 阴性对照品制备 按照咳露口服液制备工艺制得不含黄芩苷的阴性样品制剂,再取阴性样品制剂 10 mL 置于 100 mL 容量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀,静置,过滤,取续滤液,即得。

1.3.6 干扰试验考察 精密量取供试品溶液、对照品溶液、阴性对照品溶液各 15 μL,按照 1.3.2 项下的色谱条件进行分析,绘制色谱图,如图 1。供试品溶液和对照品溶液都在相同时间出现黄芩苷的色谱峰,而阴性对照品溶液则在此时间下无峰。这种情况则表明样品中其他成分对黄芩苷含量测定无影响。

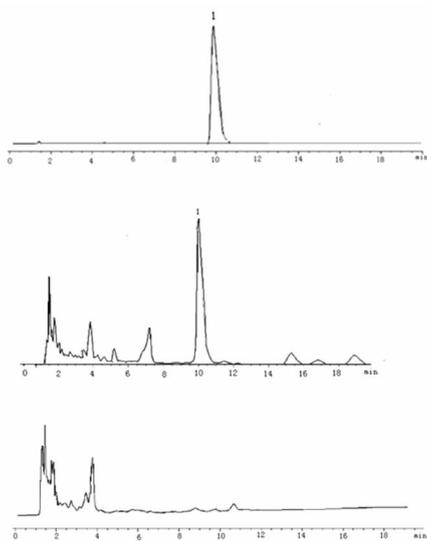


图1 咳露口服液 HPLC 图

注:A. 对照品溶液,B. 供试品溶液,C. 阴性对照品溶液请在相应图谱下标注,1. 黄芩苷。

1.3.7 线性回归方程^[8] 精密量取黄芩苷对照品溶液适量,加水稀释成系列溶液,按 1.3.2 项下色谱

条件进行测定,把进样量作为横坐标,相对应的峰面积作为纵坐标,进行线性回归,结果表明黄芩苷进样量在 0.160 5 ~ 1.259 8 μL 范围内与峰面积呈良好的线性关系,回归方程为 $Y = 2232350.6X + 282972.9$, $r = 0.9996$ ($n = 5$)。

1.3.8 样品含量测定 取样品溶液,按照 1.3.4 项下制成供试品溶液,依 1.3.2 项下色谱条件进样分析。精密吸取 15 μL 样品溶液,进样,记录峰面积,依据线性回归方程计算黄芩苷的含量。

2 结果

2.1 单因素实验考查 咳露口服液,是以水为提取溶剂,采用水提醇沉法制备而成。本研究以黄芩苷含量为考察指标,在单因素实验的基础上,根据 Box-Behnken 实验设计原理,选择对口服液提取工艺影响最显著的 3 个主要因素:提取时间、提取次数和料液比进行优化组合,试验水平表如下。

表1 实验因素水平表

水平	因素		
	A 提取时间(min)	B 提取次数(times)	C 料液比(g/mL)
1	30	1	5
2	60	2	10
3	90	3	15

2.1.1 提取时间对黄芩苷含量的影响 在固定提取次数为 1 次,料液比为 1:10 的情况下,考察提取时间对咳露口服液提取效果的影响,结果如图 3 所示。

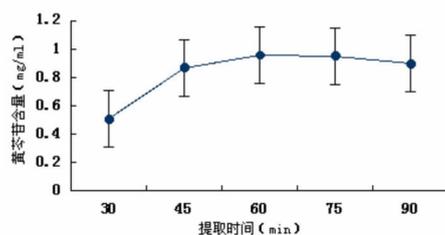


图2 提取时间对黄芩苷含量的影响

由上图可知,提取时间对咳露口服液中黄芩苷含量有明显影响,随着提取时间的增长,其含量也随之上升而后减少,当提取时间超过 60 min 时,黄芩苷含量逐渐平缓趋于下降,可能随着提取时间的延长,药材中的杂质也被相应的提出。因此选择提取时间为 60 min 作为咳露口服液的最适提取时间。

2.1.2 提取次数对黄芩苷含量的影响 在提取时间为 60 min、料液比为 1:10 的情况下,考察不同提取次数对咳露口服液提取结果的影响,结果如图 4 所示。由图 4 可知,提取次数为 1 次时,黄芩苷含量较低,随着提取次数的增加,含量也有所上升,但当

提取次数超过 2 次后,含量增长缓慢,几乎持平,从节约能源及时间综合考虑,选取提取次数为 2 次作为咳露口服液的最适提取次数。

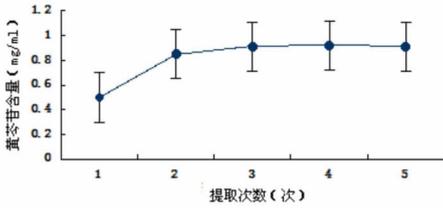


图 3 提取次数对黄芩苷含量的影响

2.1.3 料液比对黄芩苷含量的影响 固定提取时间为 60 min,提取次数为 2 次的情况下,考察不同料液比对咳露口服液工艺的影响,结果如图 5 所示。

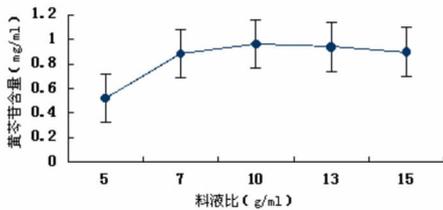


图 4 料液比对黄芩苷含量的影响

由图 5 可知,料液比对黄芩苷提取率也有很大影响,当提取溶剂量从 5 倍增加到 15 倍时,提取效果明显提高,这是因为随着溶剂的使用量越大,黄芩苷在溶剂中的溶解度就越大。液料比继续增加时,由于黄芩苷的含量趋于平缓,此时提取率的增长较为缓慢。综合实际及节约成本考虑,选取液料比 1:10 最佳。

2.2 响应面分析 在单因素试验结果基础上,以黄芩苷含量为响应值,运用 Box-Behnken 响应曲面法设计试验,三因素三水平共 15 组,其中 5 组实验为中心点试验,其余为析因试验,实验设计及结果见表 2。

回归模型方程的建立及方差分析:依据 Box-Behnken 响应曲面法对咳露口服液中黄芩苷含量的提取工艺进行优化,结果设计 15 组试验。应用 Design-Expert 8.05b 软件分析数据,得到了多元二次回归模型方程: $R_1 = 0.68733 + 0.014894A + 0.33121B + 0.12404C - 6.66667 \times 10^{-5} AB - 1.73333 \times 10^{-4} AC - 3.85000 \times 10^{-3} BC - 9.13426 \times 10^{-5} A^2 - 0.061458B^2 - 4.09833 \times 10^{-3} C^2$ 。方程式中 R_1 为黄芩苷含量, A 为提取时间, B 为提取次数, C 为料液比。

回归方差分析见表 3,从其中可以看出 P 模型 < 0.0001 , F 模型 $= 41.51 > 0.05$,说明此次研究所采用的二次多项式模型的分析方程极显著。失拟项 $F = 0.55 > 0.05$,由此可见,失拟项不显著。从以上

分析可看出,响应值与自变量之间的多元回归关系显著,可以很好的用该模型表示,最佳提取工艺条件可利用该模型确定^[9]。模型的调整确定系数 $R_{Adj}^2 = 0.9759$,说明 97.59% 的响应值变化能够用该模型解释。此外,从表 3 可以明显看出,各因素的一次项、二次项及交互项中提取时间与料液比对黄芩苷含量影响显著 ($P < 0.05$),说明各因素与黄芩苷含量间并非单纯的线性关系^[10]。由 P 值的大小可以得出各因素对黄芩苷含量的影响排序为:液料比 (C) $>$ 提取时间 (A) $>$ 提取次数 (B)。

表 2 响应面分析实验设计

试验号	A 提取时间 (min)	B 提取次数 (times)	C 料液比 (g/mL)	黄芩苷含量 (mg/mL)
1	30(-1)	3(1)	10(0)	0.782
2	60(0)	3(1)	15(1)	0.920
3	60(0)	2(0)	10(0)	0.963
4	60(0)	3(1)	5(-1)	0.697
5	90(1)	1(-1)	10(0)	0.806
6	90(1)	2(0)	5(-1)	0.731
7	60(0)	2(0)	10(0)	0.918
8	90(1)	2(0)	15(1)	0.897
9	60(0)	1(-1)	15(1)	0.885
10	60(0)	2(0)	10(0)	0.926
11	30(-1)	2(0)	15(1)	0.823
12	30(-1)	2(0)	5(-1)	0.533
13	60(0)	1(-1)	5(-1)	0.585
14	90(1)	3(1)	10(0)	0.900
15	30(-1)	1(-1)	10(0)	0.680

表 3 回归方程方差分析表

变异源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	0.24	9	0.027	41.51	0.0001 **
A	0.033	1	0.003	157.10	0.0003 **
B	0.033	1	0.015	3.17	0.0020 *
C	0.12	1	0.12	24.58	<0.0001 **
AB	1.600×10^{-5}	1	1.600×10^{-5}	0.038	0.8533
AC	3.844×10^{-3}	1	3.844×10^{-3}	9.01	0.0295 *
BC	1.482×10^{-3}	1	1.482×10^{-3}	3.51	0.1199
A ²	0.026	1	0.026	62.73	0.0005 **
B ²	0.013	1	0.013	30.39	0.0027 *
C ²	0.041	1	0.041	96.30	0.0002 **
失拟项	9.593×10^{-4}	3	3.198×10^{-4}	0.55	0.6939
误差项	1.153×10^{-3}	2	5.763×10^{-4}		
总和	0.25	14			

注:确定系数 $R^2 = 0.9914$;调整系数 $R_{Adj}^2 = 0.9759$ 。** $P < 0.001$ 为差异有显著统计学意义; * $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

依据回归方程绘制出响应曲面图及等高线图,确定提取时间、提取次数和液料比 3 个因素对咳露口服液中黄芩苷提取效果的影响,响应曲面图和等高线图如下。

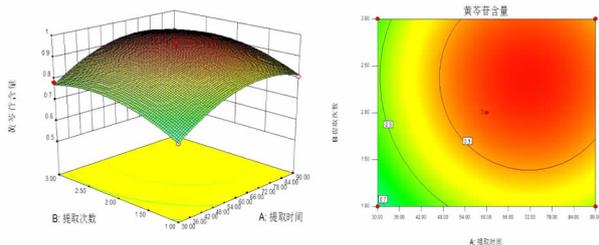


图5 提取时间和提取次数的响应曲面图与等高线图

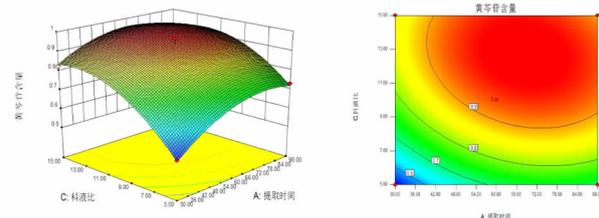


图6 提取时间和料液比的响应曲面图与等高线图

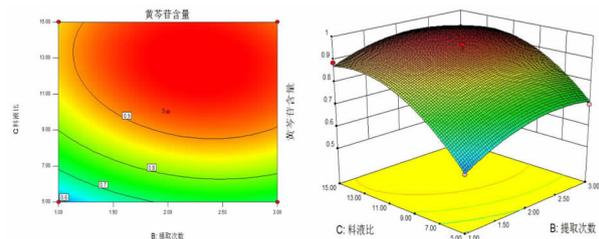


图7 提取次数和料液比的响应曲面图与等高线图

由上图可以看出3个因素的最佳参数及其之间的交互作用。从图7可以看出料液比、提取时间的交互作用比较明显,曲面较陡峭,说明提取时间和料液比对黄芩苷含量的影响较大。图6和图8的曲面较为平缓,说明提取时间与提取次数及提取次数与料液比之间的交互作用不太明显。从图6可以看出,提取时间的曲面较提取次数的曲面陡峭,说明提取时间对黄芩苷含量的影响较提取次数明显。当提取时间的范围为60~70 min,料液比的范围为11~13 g/mL,黄芩苷含量最高,此后,随着提取时间及提取次数的增加,黄芩苷含量明显降低。选定提取次数时,从图8可以看出,黄芩苷含量随着提取次数的增加呈先增大后平稳的趋势,故提取次数的最佳水平范围为2~2.5次。可以看出,该模型可以很好的反映响应值和各因素之间的关系,所以可以用此模型来优选咳露口服液的提取工艺。通过对二次回归模型的数学方程分析计算,得出咳露口服液最佳提取工艺:提取时间为68.52 min、提取次数为2.28次、料液比为12.58 g/mL,在此条件下黄芩苷含量的预测值为0.98 mg/mL。为了实际的操作便利,将最佳工艺参数确定为提取时间为70 min,提取次数为2次,料液比为13 g/mL,平行测定3次,黄芩苷含量为0.96 mg/mL,与模型预测值相差了仅0.02 mg/

mL,模拟良好。

3 讨论

提取工艺的优化传统上有正交实验和均匀试验等较为常用,传统优化方法虽然试验次数少,但精密性差^[11],不能完全作为大生产的参考。响应曲面法是集统计学、计算机科学、数学为一体,通过实验设计、构建模型、检验模型、优化最佳组合条件等对实验进行优化^[12],反应了响应值与各因素之间的影响关系,这种方法不仅实验次数少,试验时间也很短,对各因素进行了全面的优化研究^[13]。本实验对咳露口服液的提取工艺进行考察,采用单因素结合响应曲面法来优化,最终表明在提取过程中的提取时间、次数、料液比都会对咳露口服液的提取工艺有所影响。咳露口服液的优化是以黄芩苷为衡量指标,优化后的提取工艺是提取时间为70 min,提取次数为2次,料液比是1:13,口服液中黄芩苷的含量为0.96 mg/mL,为咳露口服液的提取工艺选取了更优的参数,提高了其质量标准,为中药口服液大工艺生产提供了一个良好的参照。

参考文献

- [1] 杨东花. 咳露口服液的二次开发[D]. 咸阳: 陕西中医药大学, 2012:1.
- [2] 顿宝生. 步长中成药[M]. 西安: 世界图书出版社, 2011:123-128.
- [3] 苏英英, 杨东花, 黄壮壮, 等. 高效液相色谱法测定咳露口服液中黄芩苷含量[J]. 中国药业, 2012, 21(17): 26-27.
- [4] 要利明, 朱永蒙, 赵晓龙. 高效液相色谱法在黄芩中黄芩苷含量测定的应用研究[J]. 山西医药杂志, 2013, 42(7): 462.
- [5] 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, 2010:282-283.
- [6] 万正兰, 李亚男, 田琳. 高效液相色谱法测定咳露口服液中黄芩苷的含量[J]. 中国实用医药, 2012, 7(24): 9-11.
- [7] 杨东花, 刘峰, 马久太, 等. 提高咳露口服液质量标准的研究[J]. 西北药学杂志, 2011, 26(5): 324-327.
- [8] 温华珍, 肖盛元, 王义明, 等. HPLC法测定不同规格并头黄芩的黄芩苷和汉黄芩苷含量[J]. 中草药, 2005, 36(4): 600-603.
- [9] Zhang QA, Fan XH, Zhang ZQ, et al. Optimization of SC-CO₂ extraction of oil from almond pretreated with autoclaving[J]. LWT-food Science and Technology, 2009, 42(29): 1530-1542.
- [10] 许海燕, 多本加. 响应曲面法优化超声-微波协同提取秦岭龙胆挥发油工艺研究[J]. 西部林业科学, 2014, 43(3): 37-44.
- [11] 黄芳, 黄子杰. 均匀设计及其在药学中的应用[J]. 数理医药学杂志, 2007, 20(5): 612-615.
- [12] 张淑兰, 吴燕子, 王艳梅, 等. 响应面法优化核桃隔膜总黄酮提取工艺[J]. 中国药房, 2010, 21(27): 2519-2521.
- [13] 张艳, 李永哲. 响应面法及其在药学领域中的应用[J]. 吉林化工学院学报, 2012, 29(7): 20-27.