

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2022.17.012

Box - Behnken 响应面法优化止咳祛痰糖浆中 桔梗皂苷 D 提取工艺*

江凯航^{1,2}, 刘东升^{1,2}, 朱旭江^{1,2}

(1. 甘肃省药品检验研究院, 甘肃 兰州 730070; 2. 国家药品监督管理局中药材及饮片质量控制重点实验室, 甘肃 兰州 730070)

摘要:目的 优化止咳祛痰糖浆中桔梗皂苷 D 的提取工艺。方法 以提取次数、洗涤溶剂、洗涤溶剂体积为因变量, 以桔梗皂苷 D 含量为自变量, 采用 Box - Behnken 响应面法优化桔梗皂苷 D 的提取工艺, 并进行验证。结果 优选的最佳提取工艺为, 用水饱和的正丁醇提取 5 次, 每次 30, 30, 20, 20, 20 mL; 用正丁醇饱和的氨试液洗涤 2 次, 每次 15 mL。此条件下, 每 10 mL 止咳祛痰糖浆中桔梗皂苷 D 的含量为 1.264 8 mg。结论 优选的提取工艺合理、可行, 能将止咳祛痰糖浆中的桔梗皂苷 D 基本提取完全。

关键词:止咳祛痰糖浆; 桔梗皂苷 D; Box - Behnken 响应面法; 提取工艺

中图分类号: R932; TQ460.6

文献标志码: A

文章编号: 1006-4931(2022)17-0046-04

Optimization of Extraction Process of Platycodin D in Zhike Qutan Syrup by BBD - RSM

JIANG Kaihang^{1,2}, LIU Dongsheng^{1,2}, ZHU Xujiang^{1,2}

(1. Gansu Institute for Drug Control, Lanzhou, Gansu, China 730070; 2. State Drug Administration - Key Laboratory of Quality Control of Chinese Medicinal Materials and Decoction Pieces, Lanzhou, Gansu, China 730070)

Abstract: Objective To optimize the extraction process of platycodin D in Zhike Qutan Syrup. **Methods** The extraction process of platycodin D was optimized by the Box - Behnken design - response surface methodology (BBD - RSM) with the extraction times, washing solvent and washing solvent volume as the dependent variables, and with the content of platycodin D as the independent variable, then the verification test was conducted. **Results** The optimal extraction process was as follows: extracting with water - saturated *n* - butanol for five times, with 30, 30, 20, 20, 20 mL each time, and washing with *n* - butanol - saturated ammonia test solution for two times, with 15 mL each time. With this process, the content of platycodin D in every 10 mL of Zhike Qutan Syrup was 1.264 8 mg. **Conclusion** The optimal extraction process is reasonable and feasible, which can extract platycodin D completely from Zhike Qutan Syrup.

Key words: Zhike Qutan Syrup; platycodin D; BBD - RSM; extraction process

止咳祛痰糖浆具有润肺祛痰、止咳定喘功效, 临床用于治疗伤风咳嗽、慢性支气管炎及支气管哮喘。方中, 桔梗为君药, 有宣肺、利咽、祛痰作用, 皂苷类化合物为主要活性成分和特征性成分^[1]。研究证实, 桔梗皂苷 D 是桔梗提取物中的主要活性化合物^[2]。为了确保产品质量, 保证临床用药安全、有效, 对制剂中桔梗皂苷 D 进行定量研究。桔梗皂苷与其他皂苷之间极性相近, 测定其含量时, 可用正丁醇提取, 优选其最佳提取工艺, 常采用正交试验或响应面法确定提取工艺的参数。其中, 正交试验无法获得设计变量的最优组合和响应目标的最优值, 当试验因素具有较多水平数时需进行大量试验, 实施较困难。响应面法的试验次数少, 试验周期短, 精密度高, 求得回归方程精度高, 预测性能

好, 能研究几种因素间的交互作用, 只要确定合理的影响因素与水平^[3], 即能得到较好的优化结果。本研究中以提取次数、洗涤溶剂、洗涤溶剂体积为考察因素, 以桔梗皂苷 D 含量为评价指标, 采用 Box - Behnken 响应面法优化止咳祛痰糖浆中桔梗皂苷 D 的提取工艺。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

LC - 20A 型高效液相色谱仪 (日本岛津公司); MS205DU 型分析天平 (瑞士梅特勒 - 托利多集团, 精度为十万分之一)。

1.2 试剂

桔梗皂苷 D 对照品 (中国食品药品检定研究院, 批

* 基金项目: 甘肃省药品监督管理局中药材及饮片质量控制重点实验室项目 [2021GSMPA - KL09]; 甘肃省药品产业技术扶持项目 [2019KF003]。

第一作者: 江凯航, 男, 大学本科, 研究方向为中药检验, (电子信箱) 413608231@qq.com。

号为111851-201708,含量为97.9%);止咳祛痰糖浆(康县独一味生物制药有限公司,批号分别为2001056001,2001057001,2001058001,2003057001,2003058001,2003061001,2006056001);乙腈为色谱纯,水为超纯水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 桔梗皂苷D含量测定方法建立

2.1.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱:YMC HPLC Column C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);检测器:蒸发光散射检测器(ELSD);流动相:乙腈-水(28:72, V/V);流速:1.0 mL/min;进样量:5, 20 μL(对照品溶液), 20 μL(供试品溶液)。理论板数按桔梗皂苷D峰计应不低于3 000。

2.1.2 溶液制备

取桔梗皂苷D对照品适量,精密称定,加甲醇制成质量浓度为0.497 5 mg/mL的桔梗皂苷D对照品溶液。

取样品10 mL,加水20 mL,摇匀,用水饱和的正丁醇振摇提取5次,每次30,30,20,20,20 mL,合并正丁醇液;用正丁醇饱和的氨试液洗涤2次,每次30 mL,合并氨试液;再用水饱和的正丁醇振摇提取2次,每次15 mL,合并正丁醇液。回收溶剂至干,残渣加甲醇适量使溶解,定量转移至5 mL容量瓶中,加甲醇定容,摇匀,即得供试品溶液。

按处方比例及制备工艺制备不含桔梗的阴性样品,并按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。

2.1.3 方法学考察

专属性试验:吸取2.1.2项下3种溶液各适量,按2.1.1项下色谱条件进样测定。结果供试品溶液色谱图中,在与对照品溶液色谱图相同保留时间处有色谱峰出现,阴性对照无干扰。色谱图见图1。

线性关系考察:分别精密吸取2.1.2项下对照品溶液(质量浓度为0.497 5 mg/mL)8,10,15,25,30,40 μL,以进样量($X, \mu\text{g}$)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程 $Y = 362\,965 X - 838\,129, R^2 = 0.999\,0$,

($n = 6$)。结果表明,对照品溶液进样量在3.980 2~19.901 1 μg范围内与峰面积线性关系良好。

定量限与检测限确定:取线性关系考察项下对照品溶液(质量浓度为3.980 0 mg/mL)适量,用甲醇逐级稀释,按2.1.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。当信噪比(S/N)为3:1时,计算得待测成分的检测限为0.199 0 mg/mL;当 S/N 为10:1时,计算得待测成分的定量限为0.796 0 mg/mL。

精密度试验:取2.1.2项下对照品溶液(质量浓度为0.497 5 mg/mL)20 μL,按2.1.1项下色谱条件连续进样测定6次。结果峰面积的RSD为2.40%($n = 6$),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取样品(批号为2003061001)适量,按2.1.2项下方法制备供试品溶液,取20 μL,分别于0,4,6,8,12,24 h时按2.1.1项下色谱条件进样测定。结果峰面积的RSD为1.65%($n = 6$),表明供试品溶液24 h内稳定性良好。

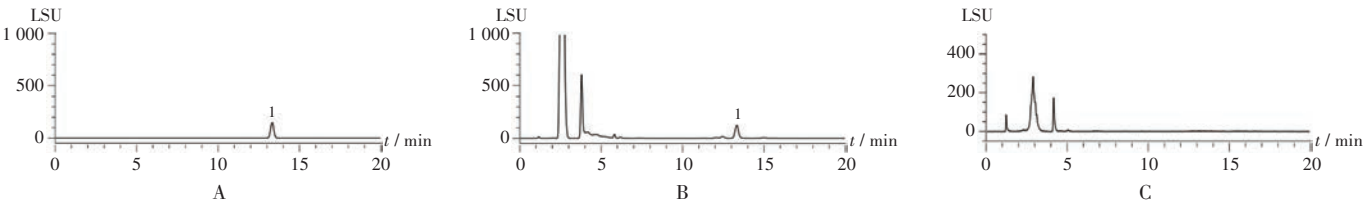
重复性试验:取样品(批号为2003061001)适量,共6份,依法制备供试品溶液,按2.1.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算含量。结果含量的RSD为1.46%($n = 6$),表明方法重复性良好。

加样回收试验:取样品(批号为2003061001)5 mL,共6份,分别加入对照品溶液(质量浓度为0.497 5 mg/mL)各1 mL,依法制备供试品溶液,按2.1.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并按外标法计算含量。结果见表1。

表1 加样回收试验结果($n = 6$)

Tab. 1 Results of the recovery test ($n = 6$)

样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD(%)
0.630 0	0.497 5	1.135 5	101.61	99.84	2.54
0.630 0	0.497 5	1.134 5	101.41		
0.630 0	0.497 5	1.103 1	95.10		
0.630 0	0.497 5	1.133 5	101.21		
0.630 0	0.497 5	1.132 0	100.90		
0.630 0	0.497 5	1.121 5	98.79		



1. 桔梗皂苷D

A. 对照品溶液 B. 供试品溶液 C. 阴性对照品溶液

图1 高效液相色谱图

1. Platycodin D

A. Reference solution B. Test solution C. Negative reference solution

Fig. 1 HPLC chromatograms

2.2 桔梗皂苷D提取方法优化

2.2.1 单因素试验

提取次数:取样品(批号为2003061001)10 mL,共6份,加水20 mL,摇匀,用水饱和的正丁醇分别振摇提取4次(每次30,30,20,20 mL),5次(每次30,30,20,20,20 mL),6次(每次30,30,20,20,20,20 mL),各2份,合并正丁醇液,用氨试液洗涤2次,每次30 mL,合并正丁醇液,回收溶剂至干,残渣加甲醇适量使溶解,定量转移至5 mL容量瓶中,加甲醇定容,摇匀,用0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,按2.1.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并按外标法计算桔梗皂苷D含量。结果用水饱和的正丁醇提取4次、5次、6次的提取液中桔梗皂苷D的平均含量分别为0.90,0.91,0.90 mg($n=3$),故选择水饱和的正丁醇提取5次,每次30,30,20,20,20 mL。

洗涤溶剂:取样品(批号为2003061001)10 mL,共6份,加水20 mL,摇匀,用水饱和的正丁醇振摇提取5次,每次30,30,20,20,20 mL,合并正丁醇液,分别用氨试液、正丁醇饱和的氨试液、正丁醇饱和的水洗涤2次,每次30 mL,各2份,正丁醇液回收溶剂至干,残渣加甲醇适量使溶解,定量转移至5 mL容量瓶中,用0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,按2.1.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并按外标法计算桔梗皂苷D含量。结果上述各洗涤溶剂中桔梗皂苷D的含量分别为0.91,1.12,0.92 mg($n=3$),故选择正丁醇饱和的氨试液洗涤2次,每次30 mL。

洗涤溶剂体积:取样品(批号为2003061001)10 mL,共6份,加水20 mL,摇匀,用水饱和的正丁醇振摇提取5次,每次30,30,20,20,20 mL,合并正丁醇液,用正丁醇饱和的氨试液洗涤2次,每次30 mL,用水饱和的正丁醇分别振摇提取0次、1次、2次,每次15 mL,各2份,合并氨试液或正丁醇液,回收溶剂至干,残渣加甲醇适量使溶解,定量转移至5 mL容量瓶中,用0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,按2.1.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并按外标法计算桔梗皂苷D含量。结果上述各洗涤溶剂中桔梗皂苷D的含量分别为1.23,1.25,1.26 mg($n=3$),故选择用水饱和的正丁醇洗涤2次,每次15 mL。

2.2.2 Box - Behnken 响应面试验

试验设计与结果:在单因素试验基础上,采用Box - Behnken 模型设计试验,以提取次数(因素A)、洗涤溶剂(因素B)、洗涤溶剂体积(因素C)为自变量,以10 mL洗涤溶剂中桔梗皂苷D含量为响应值(Y)进行响应面分析,确定最佳提取工艺条件。因素与水平见表2,试验设计与结果见表3。

表2 因素与水平

Tab.2 Factors and their levels

水平	因素A	因素B	因素C(mL)
-1	4	1(氨试液)	0
0	5	2(正丁醇饱和的氨试液)	15
1	6	3(正丁醇饱和的水)	30

表3 Box - Behnken 响应面试验设计与结果

Tab.3 Design and results of the BBD - RSM

试验号	因素			桔梗皂苷D含量(mg)	试验号	因素			桔梗皂苷D含量(mg)
	A	B	C			A	B	C	
1	1	0	1	1.25	10	-1	1	0	0.91
2	0	0	0	1.25	11	0	0	0	1.25
3	0	0	0	1.25	12	-1	0	1	1.23
4	0	0	0	1.25	13	1	-1	0	0.97
5	0	1	1	1.00	14	0	-1	1	1.05
6	-1	-1	0	0.97	15	0	0	0	1.25
7	1	1	0	0.99	16	0	1	-1	0.92
8	0	-1	-1	0.91	17	1	0	-1	1.15
9	-1	0	-1	1.10					

结果分析:采用Design - Expert. V8.0.6 软件进行回归分析,并进行二项式拟合和多元线性回归分析,得二次多项回归方程 $Y = 1.25 + 0.019 A - 0.010 B + 0.056 C + 0.020 AB - 7.500 E - 003 AC - 0.015 BC - 0.038 A^2 - 0.250 B^2 - 0.028 C^2$ 。为验证方程的有效性,对桔梗皂苷D提取的数学模型进行方差分析, $P < 0.05$ 为影响显著, $P < 0.01$ 为影响极显著,方差分析结果见表4。可见,模型 $P < 0.0001$,表明该回归模型达到了极显著水平;失拟项 $P = 0.7510 > 0.05$,表明该失拟项不显著;二项式拟合相关系数 $R^2 = 0.9997$,表明本次试验选择二项式拟合模型为成功模型;模型的修正相关系数 $R^2_{Adj} = 0.9992$,表明预测值和实测值基本吻合,预测性良好^[4],该拟合方程能准确反映提取次数、洗涤溶剂、洗涤溶剂体积对桔梗皂苷D含量的影响,一次项、交互项和二次项均达到极显著水平,故该模型可用于分析与预测止咳祛痰糖浆中桔梗皂苷D的提取工艺。

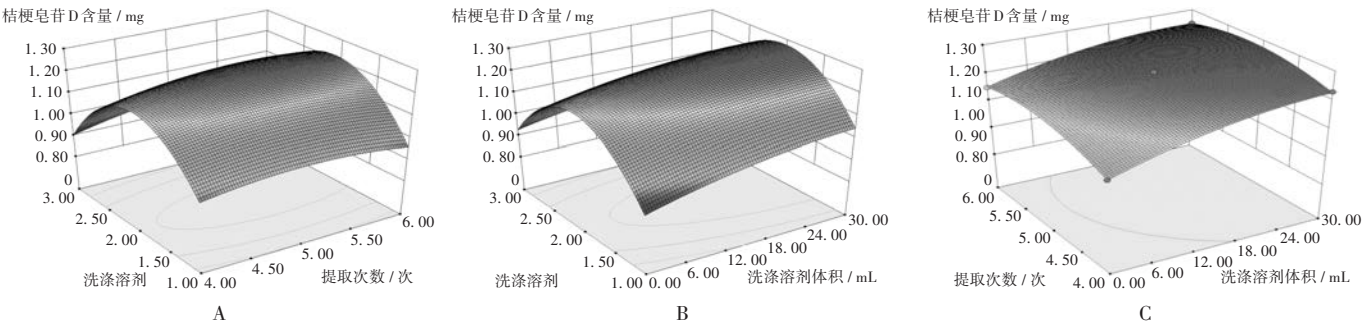
响应面分析:采用Design - Expert. V8.0.6 软件对试验结果进行分析,得到桔梗皂苷D含量与各因素交互作用的三维响应面图(图2)。可见,桔梗皂苷D含量与提取次数、洗涤溶剂、洗涤溶剂体积间的交互作用明显,与方差分析结果一致。

2.2.3 试验结果验证

利用Design Expert 软件结合Box - Behnken 响应面试验,制备了数学模型,得到最优提取工艺参数,即用水饱和的正丁醇振摇提取5次,每次30,30,20,20,20 mL;用正丁醇饱和的氨试液洗涤2次,每次15 mL。按此优选工

表4 方差分析结果
Tab. 4 Results of ANOVA

方差来源	SS	f	MS	F值	P值
模型	0.310	9	0.035	2 328.81	< 0.000 1
A	2.812E - 003	1	2.812E - 003	187.50	< 0.000 1
B	8.000E - 004	1	8.000E - 004	53.33	0.000 2
C	0.025	1	0.025	1 687.50	< 0.000 1
AB	1.600E - 003	1	1.600E - 003	106.67	< 0.000 1
AC	2.250E - 004	1	2.250E - 004	15.00	0.006 1
BC	9.000E - 004	1	9.000E - 004	60.00	0.000 1
A ²	6.000E - 003	1	6.000E - 003	400.02	< 0.000 1
B ²	0.260	1	0.260	17 578.96	< 0.000 1
C ²	3.242E - 003	1	3.242E - 003	216.16	< 0.000 1
残差	1.050E - 004	7	1.500E - 005		
失拟项	2.500E - 005	3	8.333E - 006	0.42	0.751 0
误差	8.000E - 005	4	2.000E - 005		
总离度	0.310	16			
R ²	0.999 7				
R ² _{Adj}	0.999 2				



A. 洗涤溶剂 - 提取次数 B. 洗涤溶剂 - 洗涤溶剂体积 C. 提取次数 - 洗涤溶剂体积

图2 各因素交互作用对桔梗皂苷D含量影响的响应面三维图

A. Washing solvent - extraction times B. Washing solvent - washing solvent volume C. Extraction times - washing solvent volume

Fig. 2 Three - dimensional diagrams of response surface of the effects of the two - factor interaction on the content of platycodin D

药材的入药方式,最终确定为本供试品溶液制备方法。

3.3 方法评价

本研究中建立了桔梗皂苷D含量测定的HPLC - ELSD法,并通过单因素试验和Box - Behnken 响应面法优选了止咳祛痰糖浆中桔梗皂苷D的最佳提取方法,结果直观、可靠,能将止咳祛痰糖浆中桔梗皂苷D基本提取完全。

参考文献

[1] 左 军,尹柏坤,胡晓阳. 桔梗化学成分及现代药理研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报,2019,21(1):113 - 116.
[2] 于海艳,杨 雯,王 栋,等. 桔梗皂苷提取工艺及药理作用研究进展[J]. 疾病监测与控制,2021,15(4):330 - 333.
[3] 李 莉,张 赛,何 强,等. 响应面法在试验设计与优化中的应用[J]. 实验室研究与探索,2015,34(8):41 - 45
[4] 张 婷,孙红梅,李 振,等. 响应面法优化水提醇沉玄参多糖工艺及其含量分析[J]. 中国现代中药,2021,23(4):679 - 684.
[5] 王 银,邱连建. HPLC - ELSD 法同时测定益肺清化颗粒中

艺制备3批样品,测得每10 mL样品中桔梗皂苷D的平均含量为1.264 8 mg,与理论值接近,表明该模型可靠。

3 讨论

3.1 检测器选择

在对桔梗皂苷的研究中发现,高效液相色谱 - 蒸发光散射检测器(HPLC - ELSD)法^[5]和反相高效液相色谱(RP - HPLC)法^[6]等应用较广。桔梗皂苷D无共轭结构,无强的发色基团,末端吸收检测干扰较大^[6],故紫外检测器并非桔梗皂苷D的最佳检测仪器。参考文献^[7 - 9],最终采用HPLC - ELSD法。

3.2 供试品溶液制备方法考察

参考2020年版《中国药典(一部)》桔梗(50% 甲醇提取后过硅胶柱)、桔梗冬花片和甘桔冰梅片(50% 甲醇提取后正丁醇萃取)中桔梗皂苷D的含量测定方法,当归补血口服液(直接用正丁醇萃取)、芪冬颐心口服液(直接用正丁醇萃取)中皂苷类成分黄芪甲苷的含量测定方法,以及文献^[10 - 11]中报道的桔梗皂苷D的含量测定方法,并结合桔梗药材和制剂制法项下桔梗

的黄芪甲苷、桔梗皂苷D和麦冬皂苷D的含量[J]. 天津药学,2018,30(5):11 - 13.

[6] 李喜凤,刘素梅,李振国. RP - HPLC 法测定桔梗中桔梗皂苷D的含量[J]. 中华中医药学刊,2008,26(2):283 - 284.
[7] 梁 娟,潘 见,谢慧明,等. 桔梗提取物中桔梗皂苷D的反相高效液相色谱检测方法研究[J]. 时珍国医国药,2008,19(12):2911 - 2912.
[8] 何美莲,程小卫,陈家宽,等. 桔梗皂苷类成分及其质量分析[J]. 中药新药与临床药理,2005,16(6):457 - 460.
[9] 孙印石,王建华,董其亭,等. 桔梗中桔梗总皂苷和桔梗皂苷D的超声波提取工艺[J]. 食品与发酵工业,2008,34(10):178 - 181.
[10] 邓杏好,谭梅英,张维彬. 中心组合设计效应面法优化桔梗中桔梗皂苷D的提取工艺[J]. 海峡药学,2018,30(4):40 - 42.
[11] 杨修仕,董 川,任贵兴. 桔梗皂苷D提取的响应面法优化[J]. 时珍国医国药,2011,22(3):760 - 762.

(收稿日期:2021 - 09 - 30;修回日期:2022 - 03 - 20)