

中图分类号: R943 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2023)14-0063-04
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2023.14.014



Box - Behnken 响应面法优选柴银颗粒中挥发油提取工艺*

黄孟秋^{1,2}, 邱荣英³, 李因坤¹, 李倩^{1,2}, 杜昊忱^{1,2,Δ}

(1. 鲁南厚普制药有限公司, 山东 临沂 276006; 2. 中药制药共性技术国家重点实验室 <鲁南制药集团>, 山东 临沂 276006; 3. 山东新时代药业有限公司, 山东 临沂 276006)

摘要:目的 优选柴银颗粒中挥发油的提取工艺。方法 在单因素试验基础上,以浸泡时间、加水量、提取时间为考察因素,以挥发油提取量为评价指标,采用 Box - Behnken 响应面法优选柴银颗粒中挥发油的提取工艺,并验证。结果 最佳提取工艺为浸泡 1.0 h,加 10 倍量水,提取 4.0 h。在此工艺条件下,0.4 倍处方量柴银颗粒可提取挥发油(2.60 ± 0.03)mL,RSD 为 1.17%(n = 3),与预测值的均方误差为 0.001 3。结论 优选的提取工艺稳定、可行,可为柴银颗粒的工业化生产提供参考。

关键词:柴银颗粒;挥发油;Box - Behnken 响应面法;提取工艺;工艺优选

Optimization of Extraction Process of Volatile Oil from Chaiyin Granules by Box - Behnken Design - Response Surface Methodology

HUANG Mengqiu^{1,2}, QIU Rongying³, LI Yinkun¹, LI Qian^{1,2}, DU Haochen^{1,2}

(1. Lunan Hope Pharmaceutical Co., Ltd., Linyi, Shandong, China 276006; 2. State Key Laboratory of Generic Manufacture Technology of Traditional Chinese Medicine <Lunan Pharmaceutical Group>, Linyi, Shandong, China 276006; 3. Shandong New Time Pharmaceutical Co., Ltd., Linyi, Shandong, China 276006)

Abstract: Objective To optimize the extraction process of volatile oil from Chaiyin Granules. **Methods** Based on the single factor test, the extraction process of volatile oil from Chaiyin Granules was optimized by the Box - Behnken design - response surface methodology with the soaking time, water addition amount and extraction time as the investigation factors, and with the extraction amount of volatile oil as the evaluation index. Then, the verification test was carried out. **Results** The optimal extraction process was as follows: soaking for 1.0 h, adding 10 times the amount of water, and extracting for 4.0 h. Under the above conditions, (2.60 ± 0.03) mL of volatile oil could be extracted from 0.4 times of the prescription amount, with the RSD of 1.17% (n = 3), and the mean squared error between the real value and the predicted value was 0.001 3. **Conclusion** The optimal extraction process is stable and feasible, which can provide a reference for the production process of Chaiyin Granules.

Key words: Chaiyin Granules; volatile oil; Box - Behnken design - response surface methodology; extraction process; process optimization

柴银颗粒为《伤寒六书》中的柴葛解肌汤和《温病条辨》中的银翘散化裁而成,由柴胡、金银花、黄芩、葛根、荆芥等 11 味中药组方,能清热解毒、利咽止咳,治疗

发热恶风、咳嗽、咽喉肿痛、鼻塞流涕、头痛等的效果良好^[1-3]。方中柴胡、金银花、荆芥、薄荷、鱼腥草、青蒿及连翘 7 味药材均含丰富的挥发性成分,具有发汗解热、

*基金项目:山东省重点研发计划(重大科技创新工程)项目[2020CXGC010505];山东省新旧动能转换重大产业攻关项目[鲁动能办[2021]23号];山东省临沂市兰山区科技创新发展计划专项[2026]。

第一作者:黄孟秋,女,硕士研究生,助理工程师,研究方向为中药新药研发与质量控制,(电子信箱)huangmengqiu2020@163.com。

Δ通信作者:杜昊忱,男,硕士研究生,高级工程师,研究方向为中药新药研发与质量控制,(电子信箱)duhaochen1002@163.com。

initiation[J]. Int J Dermatol, 2021, 60(7):907 - 908.

[14] TASSANEYAKUL W, TIAMKAO S, JANTARAROUNG-TONG T, et al. Association between HLA - B*1502 and carbamazepine - induced severe cutaneous adverse drug reactions in a Thai population [J]. Epilepsia, 2010, 51(5): 926 - 930.

[15] 张存玲,朱太卿,张莉峰,等. 汉族人拉莫三嗪相关过敏反应与 HLA - B*1502 的相关性[J]. 中国实用神经疾病杂志, 2020, 23(6):471 - 474.

[16] AN DM, WU XT, HU FY, et al. Association study of lamotrigine - induced cutaneous adverse reactions and HLA - B*1502 in a Han Chinese population [J]. Epilepsy Res, 2010, 92(23):226 - 230.

[17] SHI YW, MIN FL, LIU XR, et al. HLA - B alleles and lamotrigine - induced cutaneous adverse drug reactions in the Han Chinese population [J]. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2011, 109(1):42 - 46.

[18] 吴培培,李奕,杨飞,等. 抗癫痫药物等引发药疹与人类白细胞抗原基因的相关性研究[J]. 中国药理学通报, 2013, 29(1):113 - 118.

(收稿日期:2022 - 09 - 24;修回日期:2022 - 12 - 07)

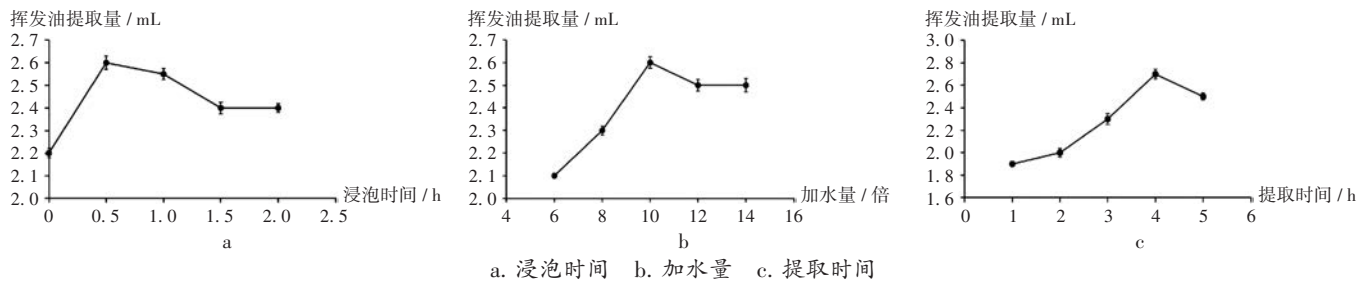


图1 单因素试验结果
a. Soaking time b. Water addition amount c. Extraction time
Fig. 1 Results of the single factor test

抗炎、抗菌、抗病毒等多种药理活性^[4-11],但其性质不稳定,长时间高温提取易造成有效成分损失,故柴银颗粒在制剂生产中会优先提取挥发油^[12]。中药挥发油提取方法包括水蒸气蒸馏法、超临界流体萃取法、微波提取法等。其中水蒸气蒸馏法具有操作简便、效率较高等优点,适用于工业化大生产^[13-15]。本研究中采用水蒸气蒸馏法对7味药材中挥发油的提取工艺进行探讨,采用Box - Behnken响应面法优选最佳提取工艺。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

ML6002T / 02型电子天平(梅特勒 - 托利多仪器 <上海>有限公司,精度为0.01 g);挥发油提取器(南京康洛达实验科技有限公司);KDM型控温电热套(山东鄞城华鲁电热仪器有限公司)。

1.2 试剂

柴胡(批号为4597210010)、金银花(批号为453021033)、薄荷(批号为452421008)、连翘(批号为453121020)的药材饮片,均购自山东百味堂中药饮片有限公司;荆芥(批号为452721002)、青蒿(批号为452828007)、鱼腥草(批号为452621005)的药材饮片,均购自安徽人民中药饮片有限公司。上述药材饮片样品均由中药制药共性技术国家重点实验室(鲁南制药集团)范建伟高级工程师鉴定为正品。

2 方法与结果

2.1 挥发油提取

根据柴银颗粒处方及工艺,按0.4倍处方量称取柴胡100 g,金银花、青蒿、连翘、薄荷、鱼腥草各75 g,荆芥50 g,置圆底烧瓶中,加适量饮用水(下同),浸泡,连接挥发油提取器及上方冷凝管,置控温电热套中加热至沸腾,并保持微沸状态,收集挥发油,测定挥发油提取量。

2.2 单因素试验

浸泡时间:按2.1项下方法,设定加水量为10倍量,提取时间为3 h,浸泡时间分别为0,0.5,1.0,1.5,2.0 h。结果见图1 a。可见,浸泡时间在0~0.5 h范围内,挥发油提取量随提取时间的延长而增多,0.5 h时达

最大值;在0.5~2.0 h范围内,挥发油提取量总体下降。故浸泡时间选择0~1.0 h。

加水量:按2.1项下方法,设定浸泡时间为0.5 h,提取时间为3.0 h,加水量分别为6,8,10,12,14倍。结果见图1 b。可见,加水量在6~10倍范围内,挥发油提取量随加水量的增加而增多,加水量为10倍量时达最大值;在10~14倍范围内,挥发油提取量总体下降。故加水量选择8~12倍。

提取时间:按2.1项下方法,设定浸泡时间为0.5 h,加水量为10倍,提取时间分别为1.0,2.0,3.0,4.0,5.0 h。结果见图1 c。可知,提取时间在1.0~4.0 h内,挥发油提取量随提取时间的延长而增多,4.0 h时达最大值;在4.0~5.0 h内,挥发油提取量总体下降。故提取时间选择3.0~5.0 h。

2.3 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Design - Expert 13软件,以浸泡时间(因素A)、加水量(因素B)、提取时间(因素C)为考察因素,以挥发油提取量为评价指标,进行Box - Behnken 响应面试验。因素与水平见表1,试验设计与结果见表2。

表1 因素与水平

Tab. 1 Factors and their levels

水平	因素A(h)	因素B(倍)	因素C(h)
-1	0	8	3.0
0	0.5	10	4.0
1	1.0	12	5.0

模型拟合与方差分析:对表2中的试验结果进行模型拟合,以各因素为自变量,以挥发油提取量(Y, mL)为因变量,可得回归方程 $Y = 2.63 + 0.1236A + 0.0523B + 0.1362C + 0.1020AB - 0.0450AC - 0.0625BC - 0.1402A^2 - 0.2469B^2 - 0.1449C^2$ 。方差分析结果(表3)显示,该模型F值为42.19, $P < 0.0001$,表明该模型有显著差异;且失拟项 $P = 0.6241 > 0.05$ (不显著),表明模型建立成功。回归方程 $R^2 = 0.98$,该模型对试验数据的拟合情况较好;决定系数 $R^2_{Adj} = 0.96$,与实测值相差

表2 Box - Behnken试验设计与结果

Tab. 2 Design and results of Box - Behnken test

试验号	因素A	因素B	因素C	挥发油提取量/mL
1	-1	0	-1	2.05
2	1	0	1	2.56
3	0	-1	-1	1.97
4	1	0	-1	2.41
5	0	-1	1	2.40
6	0	0	0	2.58
7	-1	1	0	2.08
8	-1	-1	0	2.17
9	0	0	0	2.59
10	0	1	1	2.37
11	0	0	0	2.67
12	0	0	0	2.70
13	1	0	0	2.57
14	0	0	0	2.63
15	0	1	-1	2.19
16	1	1	0	2.53
17	-1	0	1	2.38

较小,表明模型可行性较高;变异系数为1.97,信噪比为17.73,表明模型具有较高的准确度和可信性。对挥发油

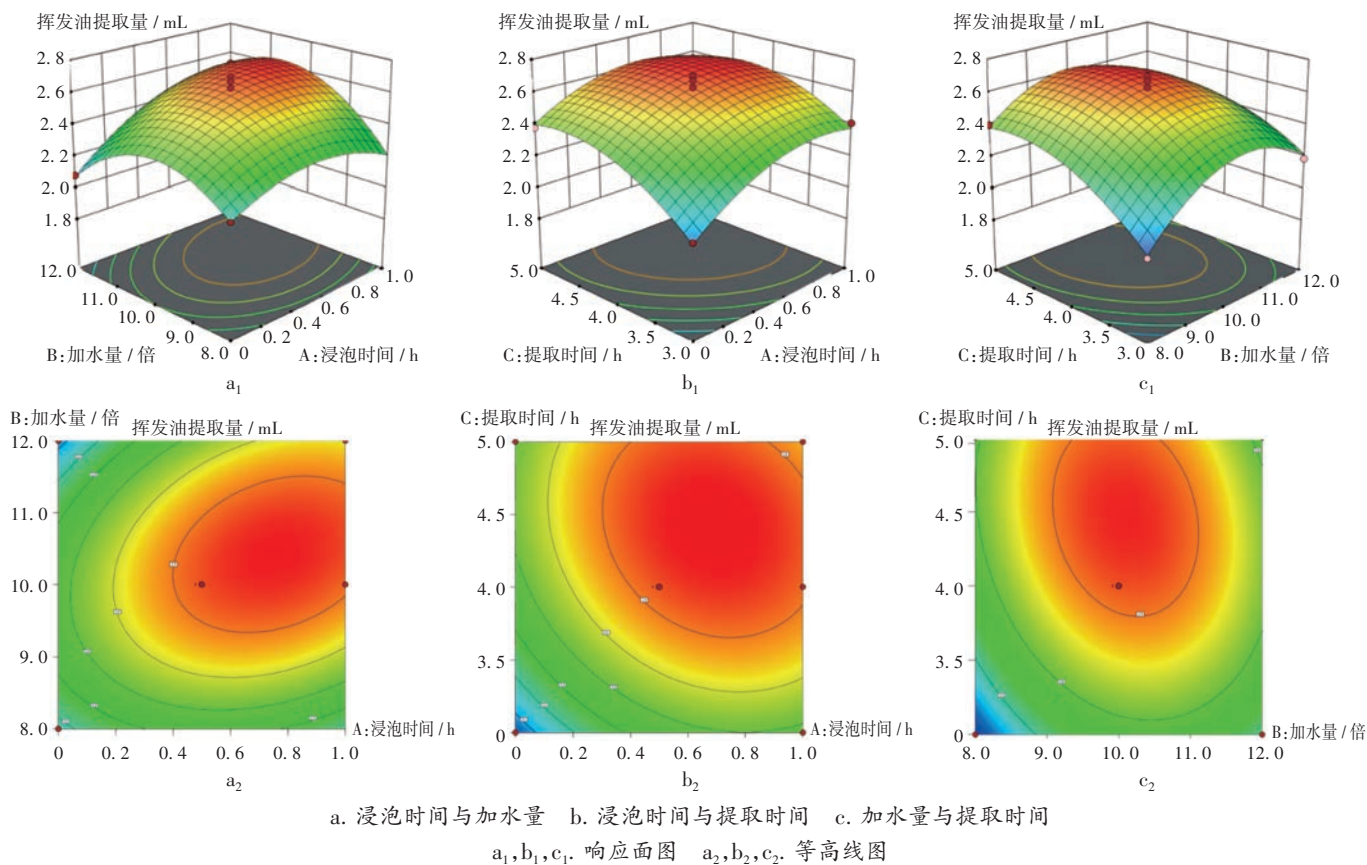
表3 方差分析结果

Tab. 3 Results of the ANOVA

方差来源	离差平方和	自由度	均方	F值	P值
模型	0.848 1	9	0.094 2	42.19	<0.000 1
A	0.102 7	1	0.102 7	45.99	0.000 3
B	0.015 4	1	0.015 4	6.88	0.034 3
C	0.148 5	1	0.148 5	66.49	<0.000 1
AB	0.022 6	1	0.022 6	10.10	0.015 5
AC	0.008 1	1	0.008 1	3.63	0.098 6
BC	0.015 6	1	0.015 6	7.00	0.033 2
A ²	0.076 4	1	0.076 4	34.20	0.000 6
B ²	0.203 3	1	0.203 3	91.02	<0.000 1
C ²	0.079 2	1	0.079 2	35.47	0.000 6
残差	0.015 6	7	0.002 2		
失拟项	0.005 1	3	0.001 7	0.65	0.624 1
纯误差	0.010 5	4	0.002 6		
总和	0.863 8	16			

提取量的影响大小顺序为因素C > 因素A > 因素B。

响应面图与等高线分析:分别以因素A、因素B、因素C为响应因子,以挥发油提取量为响应值,绘制响应面图及等高线图(图2)。初步得到挥发油最佳提取工艺



a. 浸泡时间与加水量 b. 浸泡时间与提取时间 c. 加水量与提取时间
a₁, b₁, c₁. 响应面图 a₂, b₂, c₂. 等高线图

图2 各因素间交互作用的响应面图及等高线图

a. Soaking time and water addition amount b. Soaking time and extraction time c. Water addition amount and extraction time
a₁, b₁, c₁. Response surface diagrams a₂, b₂, c₂. Contour diagrams

Fig. 2 Response surface diagrams and contour diagrams of interaction among various factors

为浸泡0.83 h,加9.9倍量水,提取4.6 h。在此条件下,挥发油提取量预测值为2.66 mL。结合实际工业生产条件,对预测的工艺参数进行微调,最终确定挥发油最佳提取工艺为浸泡1.0 h,加10倍量水,提取4.0 h。

2.4 验证试验

按2.1项下方法,根据上述最佳提取工艺进行验证试验,平行3次。结果挥发油提取量分别为2.63,2.57,2.61 mL,平均 (2.60 ± 0.03) mL, *RSD*为1.17% ($n=3$),实测值与预测值的均方误差为0.001 3。提示方程与真实试验拟合较好,优选的工艺稳定可行。

3 讨论

柴银颗粒对上呼吸道感染初期伴有的发热、咽痛、乏力等症状具有一定疗效,方中柴胡、金银花、荆芥、青蒿、连翘、薄荷、鱼腥草的挥发性成分具有发汗解表、清热解毒功效。目前,已有报道对柴胡、金银花、青蒿等单味药材中挥发油的提取工艺进行了研究^[16-18]。

本研究中单因素试验结果表明,浸泡时间、加水量及提取时间对挥发油提取量的影响均呈先升高后降低的趋势。这是由于在提取挥发油过程中,分子处于动态变化,提取时间、浸泡时间及加水量不足,不利于挥发油提取完全;提取时间和浸泡时间过长或加水量过多可能会影响挥发油分解与转化,进而降低收率。本研究中通过Box-Behnken响应面法拟合了浸泡时间、加水量、提取时间与挥发油提取量之间的函数关系,方差分析结果表明,3个因素均对制剂中挥发油的提取量有显著影响,其中提取时间影响最显著。根据Box-Behnken响应面法试验结果,考虑到能源消耗等问题,最终确定柴银颗粒中挥发油的最佳提取工艺为浸泡1.0 h,加10倍量水,提取4.0 h,可为柴银颗粒工业化生产提供参考。

挥发油提取是中药提取的重要步骤,对药物疗效有重要影响。但目前部分标准中柴银颗粒含量测定的指标性成分为黄芩苷,挥发性成分大多仅作定性鉴别,不利于全面控制柴银颗粒的质量。故在后续研究中可采用气相色谱-质谱联用法等分析柴银颗粒挥发油中的主要成分,建立相应的含量测定方法,为提升制剂质量和完善其评价标准提供参考。

参考文献

[1] 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.
[2] 赵荣华,郭姗姗,耿子涵,等.柴银颗粒对冠状病毒肺炎湿热疫毒袭肺小鼠病证结合模型治疗及作用机制研究[J].中国药物警戒,2021,18(12):1123-1128.

[3] 鲍岩岩,时宇静,郭姗姗,等.基于对免疫功能的调节探讨柴银颗粒对冠状病毒肺炎毒袭肺证的治疗作用[J].中国中药杂志,2020,45(13):3020-3027.
[4] 田丁,史梦琪,王赞.连翘挥发油化学成分及其药理作用研究进展[J].天然产物研究与开发,2018,30(10):1834-1842.
[5] 张文文,任英,张荣超,等.金银花与忍冬叶挥发油成分对小鼠淋巴细胞增殖效果研究[J].药学研究,2020,39(4):198-201.
[6] 胡倩,金司仪,李丹清,等.柴胡挥发油的研究进展[J].中南药学,2019,17(9):1499-1503.
[7] 武营雪,丁倩云,刘静,等.鱼腥草化学成分、药理及质量控制研究进展[J].药物分析杂志,2022,42(1):108-120.
[8] BAI X, LIU L, ZHANG JP, et al. Spectrum - effect relationship between GC - QTOF - MS fingerprint and antioxidant, anti - inflammatory activities of *Schizonepeta tenuifolia* essential oil[J]. Biomed Chromatogr, 2021, 35(7): e5106.
[9] PANDEY AK, SINGH P. The Genus *Artemisia*: a 2012 - 2017 Literature Review on Chemical Composition, Antimicrobial, Insecticidal and Antioxidant Activities of Essential Oils[J]. Medicines(Basel), 2017,4(3):68.
[10] LIU YY, JIANG Y, YANG YF, et al. Houittuynia Essential Oil and its Self - Microemulsion Preparation Protect Against LPS - Induced Murine Mastitis by Restoring the Blood - Milk Barrier and Inhibiting Inflammation [J]. Front Immunol, 2022,13:842189.
[11] LEE YH, WANG CM, LIU PY, et al. Volatile Oils of *Nepeta tenuifolia* (Jing Jie) as an Alternative Medicine against Multidrug - Resistant Pathogenic Microbes [J]. Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology, 2018,2018:8347403.
[12] 戚兴会,张翠云,李艳,等.响应面法优化柴银颗粒的水煎煮工艺[J].现代药物与临床,2021,36(11):2255-2258.
[13] 牛向伟,姜莉莉,周国忠,等.活血润肠胶囊挥发油的提取工艺优化及气相色谱质谱分析[J].中国药业,2020,29(19):30-32.
[14] 彭安堂,李李佳,魏艳婷,等.经典名方苓桂术甘汤中挥发油提取工艺优选[J].中国药业,2021,30(1):41-44.
[15] 刘璐,张峻颖.挥发油生产工艺和质量控制研究进展[J].中国处方药,2020,18(2):14-16.
[16] 张博文,叶耀辉,史毅,等.超声提取柴胡挥发油工艺及其GC-MS分析[J].中药材,2018,41(3):665-669.
[17] 李建军,连笑雅,任美玲,等.金银花挥发油不同提取工艺比较与成分分析[J].河南农业大学学报,2017,51(5):711-716.
[18] 李其凤,朱伟,陈沛泉,等.青蒿有效部位的提取工艺优化及驱蚊效果评价[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(8):20-22.

(收稿日期:2022-11-10;修回日期:2023-01-09)