

· 中药工业 ·

Box-Behnken设计优化小儿消积止咳制剂 提取纯化工艺[△]

高艳红^{1,2}, 刘金宇², 曹玲^{1,2}, 崔琳琳^{1,2}, 关永霞^{1,2*}, 张贵民^{1*}

1. 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;

2. 鲁南厚普制药有限公司, 山东 临沂 276006

[摘要] 目的: 优选小儿消积止咳制剂的提取纯化工艺。方法: 以辛弗林转移率、柚皮苷转移率和干物质得率为综合评价指标, 通过单因素试验及响应曲面法分别考察料液比、提取数、提取时间对小儿消积止咳制剂水提工艺的影响及浸膏相对密度、醇沉醇度、醇沉时间对小儿消积止咳制剂醇沉工艺的影响。结果: 最佳提取纯化工艺为料液比 1 : 8, 提取数 3 次, 提取时间 100 min, 醇沉浸膏相对密度 1.20, 醇沉醇度 60%, 醇沉时间 20 h。结论: 采用 Box-Behnken 设计优选的小儿消积止咳制剂提取纯化工艺科学、合理、可行。

[关键词] Box-Behnken 设计; 小儿消积止咳制剂; 提取纯化工艺

[中图分类号] R284.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1673-4890(2021)11-1967-08

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.20201202001

Optimization of Purification Process of Xiaoer Xiaoji Zhike Preparation by Box-Behnken Design

GAO Yan-hong^{1,2}, LIU Jin-yu², CAO Ling^{1,2}, CUI Lin-lin^{1,2}, GUAN Yong-xia^{1,2*}, ZHANG Gui-min^{1*}

1. State Key Laboratory of Generic Manufacture Technology of Traditional Chinese Medicine of

Lunan Pharmaceutical Group Co., Ltd., Linyi 276006, China;

2. Lunan Houpu Pharmaceutical Co., Ltd., Linyi 276006, China

[Abstract] **Objective:** To optimize the extraction and purification process of Xiaoer Xiaoji Zhike Preparation and lay a basis for the future research. **Methods:** With the transfer rate of synephrine, transfer rate of naringin, and dry matter yield as evaluation indexes, the influence of material-to-liquid ratio, extraction times, and extraction duration in the water extraction process and the effect of the relative density of the extract, volume fraction of ethanol for precipitation, and precipitation duration in the ethanol precipitation process of Xiaoer Xiaoji Zhike Preparation were investigated by single factor test and response surface methodology, respectively. **Results:** The optimal extraction and purification parameters are as follows: material-to-liquid ratio of 1 : 8, extraction for 100 min with a total of 3 times, extract density of 1.20, 60% ethanol, and precipitation for 20 h. **Conclusion:** The purification process of the Xiaoer Xiaoji Zhike Preparation optimized by Box-Behnken design is scientific, reasonable, and feasible.

[Keywords] Box-Behnken design; Xiaoer Xiaoji Zhike Preparation; extraction and purification process

小儿消积止咳制剂(口服液/颗粒)组方来源于山东中医药大学附属医院儿科名老中医毕可恩的临床经验方,由山楂、槟榔、枳实、枇杷叶、瓜蒌、连翘、莱菔子、葶苈子、蝉蜕和桔梗 10 味中药制成,具有清热肃肺、消积止咳的功效^[1],临床上用于

小儿饮食积滞、痰热蕴肺所致的咳嗽、喉间痰鸣、腹胀、口臭的治疗^[2],疗效显著,填补了国内治疗小儿食积咳嗽中成药的空白。文献报道其与阿奇霉素联合治疗小儿支原体肺炎亦有很好的疗效^[3-5]。小儿消积止咳制剂的提取纯化工艺主要为水提醇沉^[2],本

[△] **[基金项目]** 国家重点研发计划中医药现代化研究重点专项(2019YFC1711205);山东省级产业集群项目(临兰财企字[2018]43号)

* **[通信作者]** 关永霞,工程师,研究方向:新药研发与工艺优化;Tel:(0539)8336639, E-mail:13581069215@163.com
张贵民,研究员,研究方向:药物研发;Tel:(0539)8336001, E-mail:lunanzhangguimin@163.com

研究在多年生产数据积累的基础上,用SPSSAU熵值法确定了各因素的权重,确定以辛弗林转移率、柚皮苷转移率和干物质得率的综合评分为考察指标,采用Box-Behnken设计进行工艺优化^[6],最终得到了最佳提取纯化工艺。

1 材料

1.1 仪器

1260型高效液相色谱仪(安捷伦科技有限公司);XS204型电子分析天平(Mettler-Toledo公司)。

1.2 试药

对照品辛弗林(批号:110727-201809,纯度:99.5%)、柚皮苷(批号:110722-201815,纯度:93.4%)均购自中国食品药品检定研究院。

小儿消积止咳制剂提取液、醇沉液(中药制药共性技术国家重点实验室);甲醇、乙腈为色谱纯;其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 辛弗林的含量测定

2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取辛弗林对照品适量,加入50%的甲醇制成质量浓度为 $20\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溶液,即得。

2.1.2 供试品溶液的制备 精密量取药材提取液/醇沉液适量(折合成品0.5支/袋),水浴加热浓缩至约10 mL(醇沉液浓缩至无醇后加水10 mL溶解),通过聚酰胺柱(30~60目,2.5 g,内径为12.5 mm,干法装柱),用30 mL水洗脱,收集洗脱液,至50 mL量瓶中,加水至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.1.3 色谱条件 色谱柱:TURNER Kromasil 100A C_{18} (250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-甲醇-磷酸二氢钾溶液(取磷酸二氢钾0.6 g,十二烷基磺酸钠1.0 g,冰醋酸1 mL,加水溶解并稀释至1000 mL)=15:30:55;流速:0.8 mL·min⁻¹;柱温:40℃;检测波长:224 nm。

2.1.4 含量测定 分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液各10 μL ,注入液相色谱仪,测定,即得。

2.2 柚皮苷的含量测定

2.2.1 对照品溶液的制备 取柚皮苷对照品适量,精密称定,加入50%甲醇制成质量浓度为 $60\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溶液,即得。

2.2.2 供试品溶液的制备 精密量取提取液/醇沉液适量(折成品0.5支/袋),至50 mL量瓶中,加50%甲醇定容至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.2.3 色谱条件 色谱柱:Agilent ZORBAX SB C_{18} (250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇-水(35:65),流速:0.8 mL·min⁻¹;柱温:40℃;检测波长:283 nm。

2.2.4 含量测定 分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液各10 μL ,注入液相色谱仪,测定,即得。

2.3 干物质得率测定

干物质得率测定方法参考《中华人民共和国药典》(以下简称《中国药典》)2020年版(四部)通则0831“干燥失重测定法”,精密量取提取液/醇沉液10 mL,称量,记录质量,水浴蒸干,置于105℃烘箱,干燥至质量恒定,干燥器中冷却至室温,称质量,计算干物质得率。

2.4 评价指标

《中国药典》2020年版一部小儿消积止咳口服液项下的含量测定项为辛弗林,小儿消积止咳颗粒的含量测定项为柚皮苷。此外,干物质得率也是衡量工艺的重要指标。根据多年生产数据,经SPSSAU熵值法计算确定,水提工艺综合指标(Y_1)中辛弗林转移率(R_1)、柚皮苷转移率(R_2)、干物质得率(R_3)的权重系数分别为23.15%、21.98%、54.87%,醇沉工艺综合指标(Y_2)中辛弗林转移率(R_4)、柚皮苷转移率(R_5)、干物质转移率(R_6)的权重系数分别为32.97%、38.48%、28.55%。

$$Y_1=(R_1\times 23.15\%+R_2\times 21.98\%+R_3\times 54.87\%)\times 100 \quad (1)$$

$$Y_2=(R_4\times 32.97\%+R_5\times 38.48\%+R_6\times 28.55\%)\times 100 \quad (2)$$

2.5 水提单因素试验

2.5.1 料液比对水提工艺的影响 固定提取时间为60 min,提取数为2次,考察料液比(1:4、1:6、1:8、1:10)对水提效果的影响,结果见图1。由图1可知,料液比在1:4~1:8时,料液比增加, Y_1 随之增加,当料液为1:8~1:10时, Y_1 趋于稳定。因此,选择料液在1:6~1:8进行后续Box-Behnken响应面优化水提工艺。

2.5.2 提取数对水提工艺的影响 固定提取时间为60 min,料液比为1:8,考察提取数(1、2、3、4次)对水提效果的影响,结果见图2。由图2可知,

提取数在1~4时,随着提取数的增加, Y_1 先增加后略有降低。因此,选择提取数在1~3进行后续 Box-Behnken 响应面优化水提工艺。

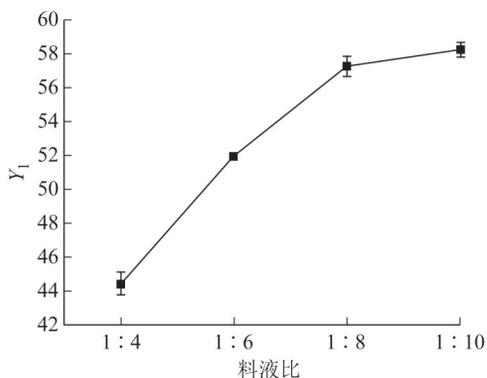


图1 料液比对小儿消积止咳制剂水提效果的影响 ($\bar{x} \pm s, n=4$)

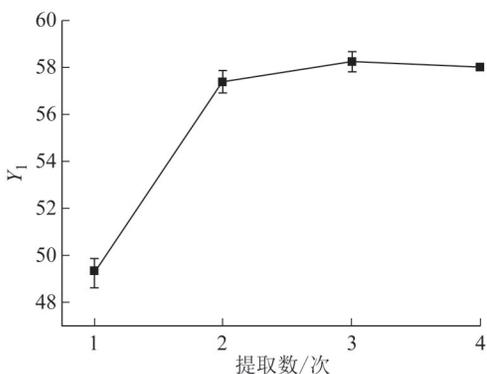


图2 提取数对小儿消积止咳制剂水提效果的影响 ($\bar{x} \pm s, n=4$)

2.5.3 提取时间对水提工艺的影响 固定料液比为1:8,提取数为2次,考察提取时间(30、60、90、120、150 min)对水提效果的影响,结果见图3。由图3可知,随着提取时间的增加, Y_1 先增加后降低。因此,选择提取时间60~120 min进行后续 Box-Behnken 响应面优化水提工艺。

2.6 Box-Behnken 响应面法优化水提工艺

2.6.1 水提方案设计及试验结果 依据 Box-Behnken 响应面设计原理,结合上述水提单因素试验结果,进行因素水平设计与试验。因素水平见表1,设计及结果见表2~3。

2.6.2 水提模型拟合及方差分析 采用 Design-Expert 8.0.6 软件对试验结果进行分析,得到回归方程: $Y_1 = 57.58 + 5.79A + 1.31B + 1.03C + 0.83AB - 0.52AC - 0.019BC - 4.32A^2 - 1.28B^2 - 0.82C^2$, $r = 0.9232$ 。结果显示,建立的回归整体模型 $P < 0.01$ 。

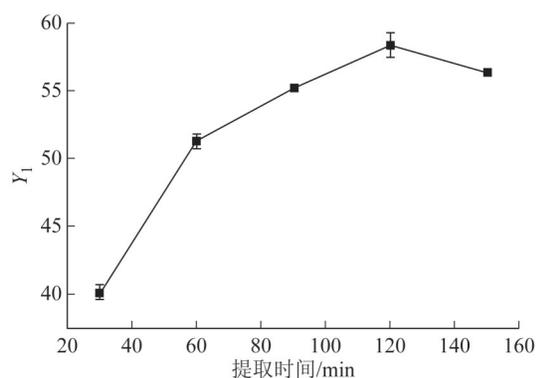


图3 提取时间对小儿消积止咳制剂水提效果的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

表1 小儿消积止咳制剂水提工艺因素水平

水平	因素		
	料液比 (A)	提取数 (B) /次	提取时间 (C) /min
-1	1:6	1	60
0	1:7	2	90
1	1:8	3	120

表2 小儿消积止咳制剂水提工艺 Box-Behnken 响应面设计试验设计及结果

试验号	A	B	C	$R_1/\%$	$R_2/\%$	$R_3/\%$	Y_1
1	0	-1	1	89.97	81.42	30.24	55.32
2	0	1	1	88.64	86.53	32.56	57.41
3	0	-1	-1	90.03	84.01	25.89	53.51
4	0	1	-1	89.23	86.18	29.29	55.67
5	0	0	0	94.28	91.32	32.70	59.84
6	-1	0	-1	81.86	51.56	25.12	44.07
7	-1	0	1	70.92	72.48	27.52	47.45
8	-1	1	0	75.65	67.28	28.27	47.81
9	-1	-1	0	76.66	56.31	29.57	46.35
10	0	0	0	94.78	88.27	28.45	56.95
11	1	0	-1	92.59	87.47	32.45	58.47
12	1	0	1	89.51	90.45	34.91	59.76
13	1	1	0	90.25	94.02	32.27	59.27
14	1	-1	0	82.86	81.99	31.48	54.48
15	0	0	0	92.08	87.15	30.43	57.17
16	0	0	0	94.34	86.32	29.18	56.82
17	0	0	0	89.67	87.21	31.32	57.11

失拟项 $P > 0.01$, 不显著, 模型成立。

A 和 A^2 2 个因素差异有统计学意义 ($P < 0.01$), B 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 3 个因素对 Y_1 的交互影响分别见图4~6, 可看出, A 的响应面曲线陡峭且等高线密集, 因此, 对水提效果影响最大的因素为料液比。

2.6.3 水提工艺验证 通过模型分析可以确定水提最佳工艺: 料液比为1:8, 提取数为2.84次, 提取

表3 小儿消积止咳制剂水提工艺响应面二次回归方程方差分析结果

差异来源	自由度	平方和	F值	P值
模型	9	387.660 0	22.390 0	0.000 2
A	1	267.960 0	139.310 0	0.000 1
B	1	13.780 0	7.160 0	0.031 7
C	1	8.450 0	4.390 0	0.074 4
AB	1	2.770 0	1.440 0	0.269 0
AC	1	1.090 0	0.570 0	0.475 7
BC	1	0.001 2	0.000 6	0.980 6
A ²	1	78.590 0	40.860 0	0.000 4
B ²	1	6.900 0	3.590 0	0.100 1
C ²	1	2.830 0	1.470 0	0.264 3
残差	7	13.460 0		
失拟项	3	6.990 0	1.440 0	0.355 8
纯误差	4	6.470 0		
总差	16	401.120 0		

时间为 99 min, 此时 $Y_{1\max}=60.02$ 。结合生产实际, 修正最佳提取工艺: 料液比为 1:8, 提取数为 3 次, 提取时间为 100 min。在该工艺下重复试验 3 次, Y_1 分别为 59.58、59.63、58.73, 平均值为 59.31, RSD 为 0.85%, 接近预测值, 说明优选的水提工艺稳定可行。

2.7 醇沉单因素试验

2.7.1 浸膏相对密度对醇沉工艺的影响 固定醇沉时间为 24 h, 醇沉醇度为 60%, 考察醇沉前浸膏相对密度 (1.10、1.15、1.20、1.25、1.30) 对醇沉效果的影响, 结果见图 7。由图 7 可知, 随着相对密度的提高, Y_2 先增加后降低。因此, 选择相对密度 1.15~1.25 进行后续 Box-Behnken 响应面优化醇沉工艺。

2.7.2 醇沉醇度对醇沉工艺的影响 固定醇沉前浸膏相对密度为 1.23, 醇沉时间为 24 h, 考察醇沉醇

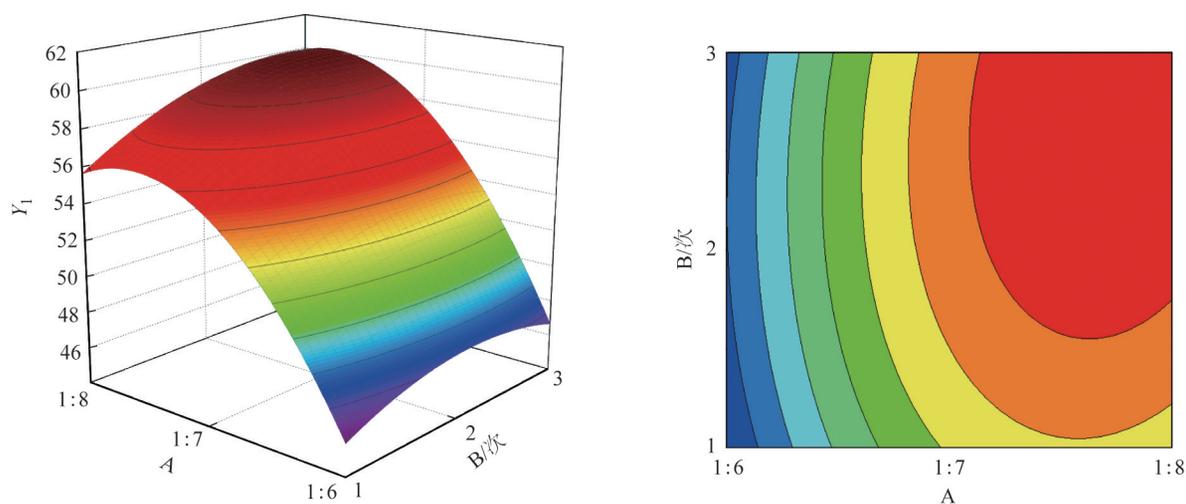


图4 料液比和提取数对小儿消积止咳制剂水提工艺的影响

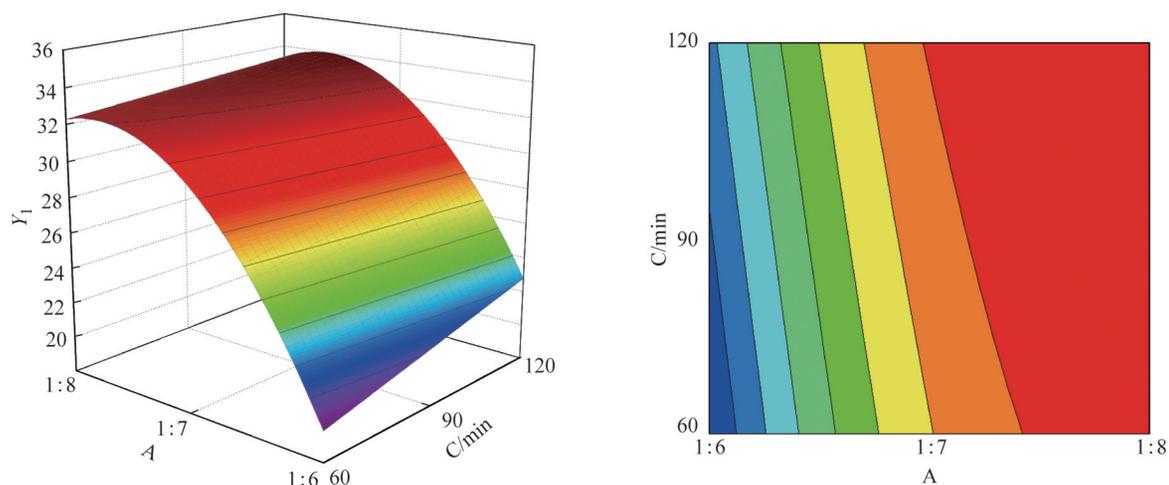


图5 料液比和提取时间对小儿消积止咳制剂水提工艺的影响

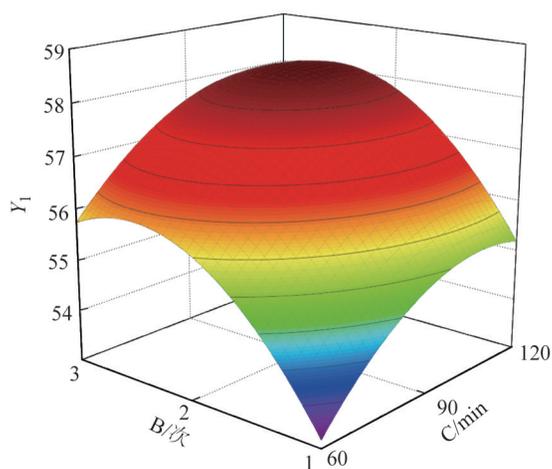


图6 提取数和提取时间对小儿消积止咳制剂水提工艺的影响

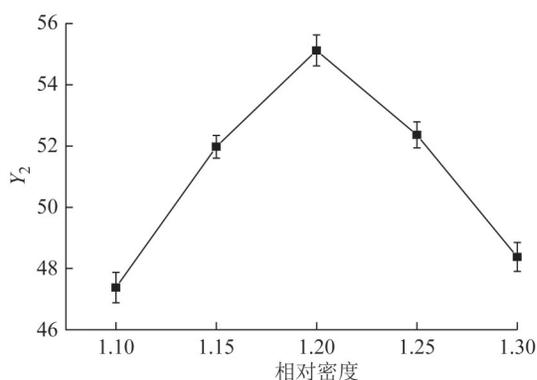
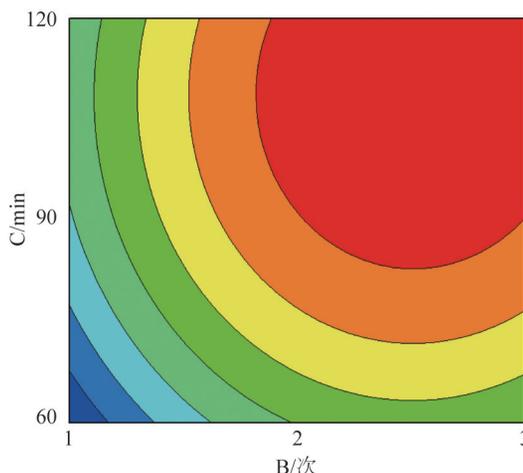


图7 浸膏相对密度对小儿消积止咳制剂醇沉效果的影响
($\bar{x} \pm s, n=5$)

度(50%、60%、70%、80%)对醇沉效果的影响,结果见图8。由图8可知,随着醇沉醇度的提高, Y_2 先增加后降低。因此,选择醇沉醇度50%~70%进行后续Box-Behnken响应面优化醇沉工艺。

2.7.3 醇沉时间对醇沉工艺的影响 固定醇沉前浸膏相对密度为1.23,醇沉醇度为60%,考察醇沉时

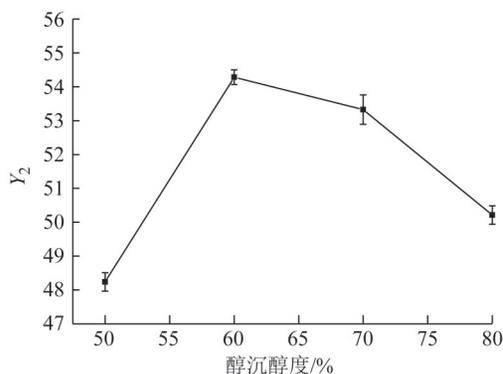


图8 醇沉醇度对小儿消积止咳制剂醇沉效果的影响
($\bar{x} \pm s, n=4$)

间(12、24、36、48 h)对醇沉效果的影响,结果见图9。由图9可知,随着醇沉时间的增加, Y_2 先增加后趋于稳定。因此,选择醇沉时间12~36 h进行后续Box-Behnken响应面优化醇沉工艺。

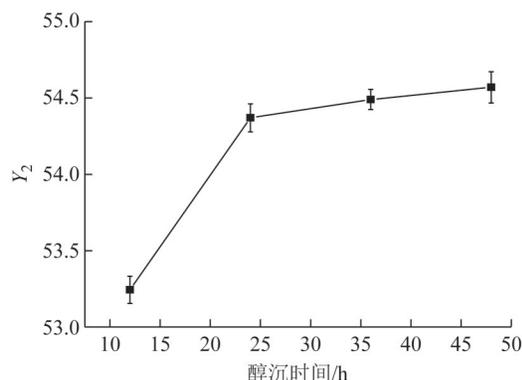


图9 醇沉时间对小儿消积止咳制剂醇沉效果的影响
($\bar{x} \pm s, n=4$)

2.8 Box-Behnken响应面法优化醇沉工艺

2.8.1 醇沉方案设计及试验结果 依据Box-Behnken响应面试验设计原理,结合上述醇沉单因素试验结果,进行因素水平设计与试验。因素水平见表4,试验设计及结果见表5~6。

2.8.2 醇沉模型拟合及方差分析 采用Design-Expert 8.0.6软件对试验结果进行分析,得到回归方

表4 小儿消积止咳制剂醇沉因素水平

水平	因素		
	浸膏相对密度(D)	醇沉醇度(E)/%	醇沉时间(F)/h
-1	1.15	50	12
0	1.20	60	24
1	1.25	70	36

表5 小儿消积止咳制剂醇沉工艺 Box-Behnken 响应面设计及其结果

试验号	D	E	F	$R_d/\%$	$R_e/\%$	$R_f/\%$	Y_2
1	0	-1	1	45.3	67.62	59.36	57.90
2	0	1	1	48.1	66.3	61.94	59.05
3	0	-1	-1	70.8	72.99	63.07	69.44
4	0	1	-1	49.2	71.11	63.46	61.70
5	0	0	0	74.3	80.61	68.03	74.94
6	-1	0	-1	48.9	60.12	42.05	51.26
7	-1	0	1	49.1	68.66	45.55	55.61
8	-1	1	0	55.8	66.21	40.64	55.48
9	-1	-1	0	49.3	62.35	40.24	51.75
10	0	0	0	73.8	81.55	66.74	75.10
11	1	0	-1	58.1	83.98	64.71	69.95
12	1	0	1	45.5	69.62	56.26	57.85
13	1	1	0	49.5	71.67	62.87	61.85
14	1	-1	0	57.2	75.44	62.19	65.64
15	0	0	0	71.9	78.89	67.8	73.07
16	0	0	0	75.3	82.21	68.56	76.03
17	0	0	0	73.8	81.55	66.74	75.10

表6 小儿消积止咳制剂醇沉工艺响应面二次回归方程方差分析结果

差异来源	自由度	平方和	F值	P值
模型	9	1 203.58	61.59	<0.000 1
D	1	212.18	97.71	<0.000 1
E	1	5.51	2.54	0.155 2
F	1	60.61	27.71	0.001 2
DE	1	14.18	6.53	0.037 8
DF	1	67.65	31.15	0.000 8
EF	1	19.76	9.10	0.019 5
D ²	1	398.93	183.72	<0.000 1
E ²	1	171.32	78.90	<0.000 1
F ²	1	171.86	79.14	<0.000 1
残差	7	15.20		
失拟项	3	10.59	3.06	0.154 2
纯误差	4	4.62		
总差	16	1 218.78		

程： $Y_2=74.79+5.15D-0.83E-2.74F-1.88DE-4.11DF+2.22EF-9.73D^2-6.38E^2-6.39F^2$ ， $r=0.9715$ 。结果显示，建立的回归整体模型其 $P<0.01$ ，达到极显著水平。失拟项 $P>0.01$ ，不显著，模型成立。由结果分析可知，以 Y_2 为响应值时，模型一次项影响顺序分别为 $D>F>E$ ，其一次项D、二次项DF、D²、E²、F²差异有统计学意义（ $P<0.001$ ），一次项F、二次项DE、EF差异有统计学意义（ $P<0.05$ ）；3个因素对 Y_2 的交互影响分别见图10~12。

2.8.3 醇沉工艺验证 通过模型分析可以确定醇沉最佳工艺：浸膏相对密度1.218，醇沉醇度58.2%，醇沉时间19.68 h，在此条件下，评价指标 $Y_{2max}=76.28$ 。结合生产实际，修正最佳醇沉工艺为浸膏相对密度1.20，醇沉醇度60%，醇沉时间20 h。在该工艺下重复试验3次， Y_2 分别为76.16、75.19、75.87，平均值为75.74，RSD为0.66%，接近预测值，说明模型可靠，优选的醇沉工艺可行。

3 结论

小儿积食是指因食物积滞于内而出现不思饮食、腹胀、腹痛、呕吐等，严重影响小儿消化吸收及生长发育。目前，临床西医治疗小儿急性支气管炎伴积食主要以抗生素控制感染及对症干预为主，可有效促进患儿症状改善及病情恢复，但尚无法完全满足临床需求^[7]。近年来，中医药在儿科疾病的诊治中发挥着越来越重要的作用，中药制剂可根据小儿的生理病理特点，发挥中医整体观念、辨证论治的优势，在改善临床症状的同时减少病原体的侵袭，而且不良反应较少^[8]。小儿消积止咳制剂是一种具有清热肃肺、消积止咳功效的中成药，可用于治疗小儿痰热蕴肺所致的咳嗽，在临床中常与阿奇霉素联合用于小儿支原体肺炎的治疗，并取得了良好的疗效^[4]。

Box-Behnken是一种优化多变量系统的统计方法，可通过多元二次回归方程拟合多个因素与多个响应值之间的函数关系，通过回归方程数学模型寻求最佳条件和参数，从而获得较为精确的最佳工艺参数和响应目标的最优值^[9]。近年来，该方法已经被广泛应用于中药及复方有效成分的提取纯化工艺优化。

本研究采用Box-Behnken对小儿消积止咳制剂的提取纯化工艺进行优化，使处方中各药的有效成分最大限度地溶出，并尽可能降低杂质的含量，以增加制剂的稳定性，提高临床疗效。最终优选出的提取纯化条件为料液比1:8，提取数为3次，提取时间为100 min，醇沉浸膏相对密度1.20，醇沉醇度60%，醇沉时间20 h。经验证，应用Box-Behnken设计所得的小儿消积止咳制剂纯化工艺稳定可行、重现性良好，为后续药物制剂及临床药效的发挥提供参考。

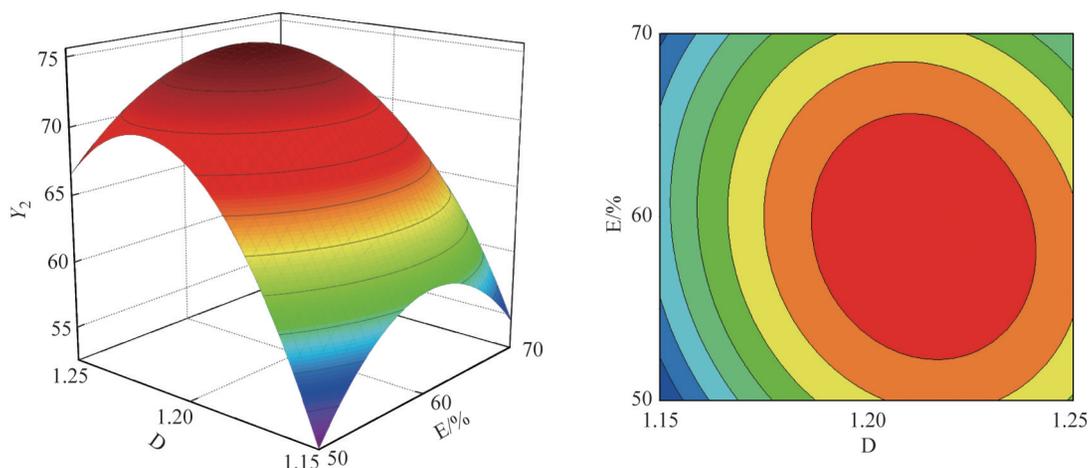


图10 浸膏相对密度和醇沉醇度对小儿消积止咳制剂醇沉效果的影响

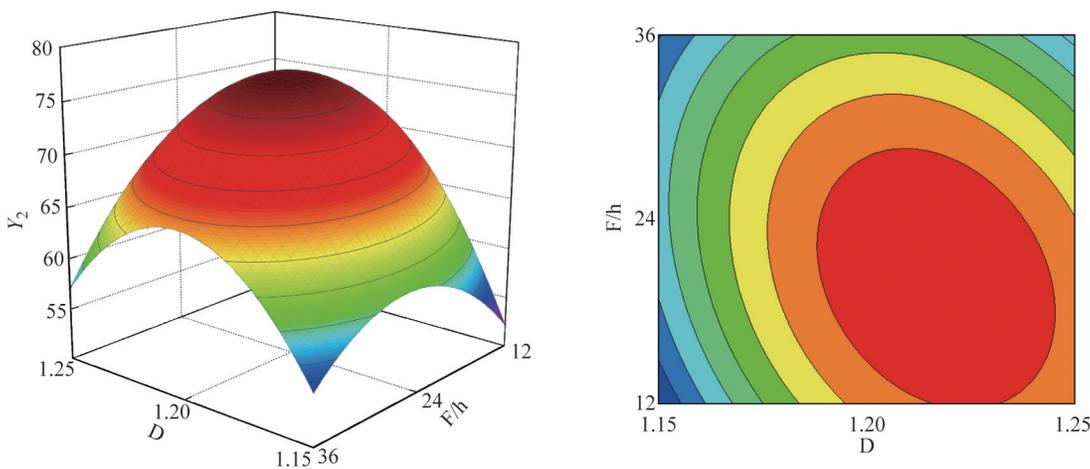


图11 浸膏相对密度和醇沉时间对小儿消积止咳制剂醇沉效果的影响

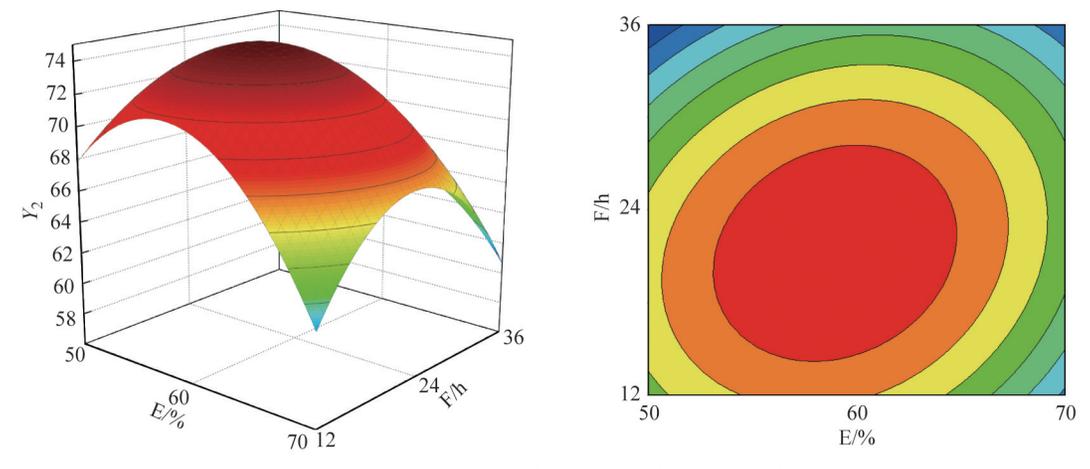


图12 醇沉醇度和醇沉时间对小儿消积止咳制剂醇沉效果的影响

参考文献

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2020:581.
 [2] 毕可恩. 一种治疗小儿食积咳嗽的中药组合物及其制

备方法:CN1425447[P]. 2003-06-25.
 [3] 黄玉克. 小儿消积止咳口服液在小儿支原体肺炎中的应用效果[J]. 河南医学研究, 2019, 28(18): 3401-3402.

- [4] 李天力,蒲凤兰,吴洋,等. 小儿消积止咳口服液联合阿奇霉素治疗小儿支原体肺炎的系统评价与Meta分析[J]. 中国中药杂志,2020,45(9):2193-2202.
- [5] 李淑梅. 阿奇霉素联合消积止咳口服液治疗小儿支原体肺炎的效果评价[J]. 吉林医学,2017,38(10):1938-1939.
- [6] 高艳红,刘仁涛,武光云,等. 基于Box-Behnken响应面优化的当归挥发油胶体磨包合工艺[J]. 现代中药研究与实践,2020,34(2):49-53.
- [7] 胡跃华. 阿奇霉素联合小儿消积止咳口服液治疗小儿支原体肺炎的疗效观察[J]. 中国社区医师,2018,34(13):105-106.
- [8] 潘乐英,吴晔,黄伟,等. 小儿消积止咳颗粒治疗小儿急性支气管炎伴积食的疗效观察[J]. 药物评价研究,2020,43(10):2021-2025.
- [9] 耿嘉,刘越敏,孙雅馨,等. 响应曲面分析法研究5-FU温热化疗对BGC-823细胞增殖的影响[J]. 中国现代应用药学,2020,37(12):1433-1437.

(收稿日期: 2020-12-02 编辑: 王笑辉)