Box-Behnken 响应曲面法优化养胃颗粒提取工艺

杨耿[1]，吕媛媛[1]，孙晓译[1]，夏正燕[1]，王中昌[2]，傅迎[2]，黄红霞[1*](1.浙大城市学院医学院，杭州 310015；2.正大青春宝药业有限公司，杭州 310013)

摘要：目的 研究养胃颗粒提取工艺参数与质控指标的关系，确定最佳工艺参数提高提取效率。**方法** 采用 Box-Behnken 实验设计方法对养胃颗粒提取工艺中加水量、加水温度和煎煮温度 3 个参数与质控指标芍药苷含量的相关性进行研究，即考察加水量、加水温度和煎煮温度对芍药苷提取率的影响，建立工艺参数与质控指标之间的回归模型，确定最佳工艺参数，并加以验证。**结果** 加水温度、加水量和煎煮温度 3 个工艺参数对养胃颗粒中芍药苷的提取率均有影响，其中加水量和煎煮温度对芍药苷提取率的影响显著。经过优化，确定最佳工艺参数：加水温度 37.8 ℃，加水量为药材总质量的 4 倍，煎煮温度 94.7 ℃。在最佳工艺参数下进行提取，理论芍药苷质量含量可达到 0.192 4 g·g^{-1}。采用优化条件平行操作 3 次，得到的平均芍药苷含量为 0.189 2 g·g^{-1}，接近预测值。该数值相对于未优化前(按制药厂实际生产工艺条件实验值 0.137 4 g·g^{-1})提高了 37.7%。**结论** 研究建立的量化模型有利于工艺参数的精确控制，提高了提取效率，有利于养胃颗粒质量的提升。

关键词：养胃颗粒；工艺优化；Box-Behnken 实验设计；质控指标

中图分类号：R284.2　　**文献标志码：**B　　**文章编号：**1007-7693(2021)16-1964-06

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2021.16.007

引用本文：杨耿，吕媛媛，孙晓译，等. Box-Behnken 响应曲面法优化养胃颗粒提取工艺[J]. 中国现代应用药学，2021，38(16)：1964-1969.

Optimization of Extract Process of Yangwei Granules by Box-Behnken Response Surface Methodology

YANG Geng[1], LYU Yuanyuan[1], SUN Xiaoyi[1], XIA Zhengyan[1], WANG Zhongchang[2], FU Ying[2], HUANG Hongxia[1*](*1.School of Medicine, Zhejiang University City College, Hangzhou 310015, China; 2.Chiatai Qingchunbao Pharmaceutical Co. Ltd., Hangzhou 310013, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the relationship between the extraction parameters and quality control indexes of Yangwei granules, to determine the optimal process parameters to improve the extraction efficiency. **METHODS** The Box-Behnken experimental design method was used to study the correlation between the three parameters of water addition, water volume temperature and decoction temperature in the extraction process of Yangwei granules and the content of paeoniflorin, the quality control index, that is, the investigation of water volume, water addition temperature and decoction. The optimal process parameters were determined by the multiple regression model, and were further confirmed. **RESULTS** The study revealed that the extraction rate of paeoniflorin in Yangwei granules was directly influenced by water temperature, water volume and decoction temperature. Among these three process parameters, the water volume and decoction temperature have significant effects. Optimal process parameters for the extraction were water temperature of 37.8 ℃, water volume of four times the weight of medicinal material, and decoction temperature of 94.7 ℃. An average content of paeoniflorin from three independent experiments under optimized operations was 0.189 2 g·g^{-1}, which was close to the theoretical value 0.192 4 g·g^{-1}. It was 37.7% higher than that of non-optimized conditions(0.137 4 g·g^{-1}). **CONCLUSION** The quantitative model established in the research is conducive to the precise control of process parameters and to increase the extraction efficiency, resulting in the improvement of the quality of Yangwei granules.

KEYWORDS: Yangwei granules; process optimization; Box-Behnken experimental design; quality indicator

养胃颗粒由黄芪、白芍、党参、山药、香附、陈皮、乌梅和甘草 8 味药材组方，具有养胃健脾、理气和中的功效，临床上常用于治疗脾虚气滞所致的胃痛[1-2]。芍药苷[3]作为其中有效成分之一，具有较好的舒张血管、镇痛镇静、抗炎抗溃疡、解热解痉、利尿、预防老年性痴呆等方面的作用。中国药典 2020 年版将芍药苷作为养胃颗粒的质控指标[4]。养胃颗粒生产工艺复杂，包括提取、浓缩、

基金项目：浙江省中医药科技计划项目(2015ZQ022)；浙江省公益事业技术研究项目(LGF21H300001)；杭州市科技计划项目(20180533B09，20191203B48)

作者简介：杨耿，男，博士，副教授　Tel: (0571)88284325　E-mail: yangg@zucc.edu.cn　***通信作者：**黄红霞，女，博士，讲师　Tel: (0571)88284325　E-mail: huanghx@zucc.edu.cn

制粒等多个工艺环节，其中提取作为养胃颗粒生产的首个环节，其工艺的优劣直接影响产品的质量。影响提取工艺的因素众多，如加热温度、加水量、提取次数和药材的投料比例等[5-7]。作为中国药典收载处方，养胃颗粒提取工艺处方组成和各味药材的用量虽已有明确规定[4]，但并不涉及加水量、煎煮温度等工艺参数，迄今国内外也鲜有对养胃颗粒提取工艺的研究报道。因此，辨析养胃颗粒提取工艺参数与质量指标之间的关系，以量化模型取代经验方法，有利于工艺参数的精确控制，进而有利于养胃颗粒产品质量的提升。

本实验采用 Box-Behnken 实验设计方法，深入研究养胃颗粒提取工艺参数与质控指标芍药苷含量的关系，即加水温度、加水量和煎煮温度对芍药苷提取效果的影响，建立工艺参数与质控指标之间的回归模型，确定最佳工艺参数，用于指导生产。

1 仪器与试剂

Agilent 1100 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司)，配四元梯度泵、自动进样器、柱温箱、紫外检测器、Agilent ChemStation 工作站，色谱柱为 Zorbax SB-C_{18} 柱(250 mm×4.6 mm，5 μm)；AL204 型分析天平(瑞士 Mettler-Toledo 公司)；TC-15 型 3 L 加热套(浙江海宁市华星仪器厂)；多功能提取设备(实验室自组装)；60 目筛(浙江上虞市纱筛厂)；Mini Spin 离心机(德国 Eppendorf 公司)；Mill-Q 超纯水系统(美国 Millipore 公司)。

实验中炙黄芪、白芍、山药、乌梅、甘草、香附和党参药材均由正大青春宝药业有限公司提供，药材批号依次为 15021，15013，15034，15025，15020，15008 和 15018。色谱纯甲醇购自美国 Tedia 公司。实验用水为超纯水系统制备的高纯去离子水。芍药苷对照品(中国药品生物制品检定所，批号：130028；纯度≥98%)。

2 方法

2.1 一次提取工艺

根据养胃颗粒生产提取的批量，等比例缩小，取炙黄芪 50.0 g、白芍 50.0 g、山药 50.0 g、生香附 50.0 g、党参 33.3 g、甘草 28.1 g 和乌梅 16.7 g，置于 3 L 三颈圆底烧瓶中，按照实验设计项下各工艺参数，使用加热套煎煮提取 2 h，提取液趁热经 60 目过滤，弃去初滤液，取续滤液，备用。

2.2 分析方法

2.2.1 色谱条件　测定芍药苷含量参照中国药典 2020 年版中养胃颗粒含量测定项[4]下执行。流动相：30%甲醇-水溶液；流速：0.5 mL·min^{-1}；检测波长：230 nm；柱温：30 ℃；进样量：6 μL。在上述色谱条件下样品中芍药苷与其他成分分离较好，峰形对称，保留时间为 9.3 min。芍药苷对照品及提取液样品色谱见图 1。

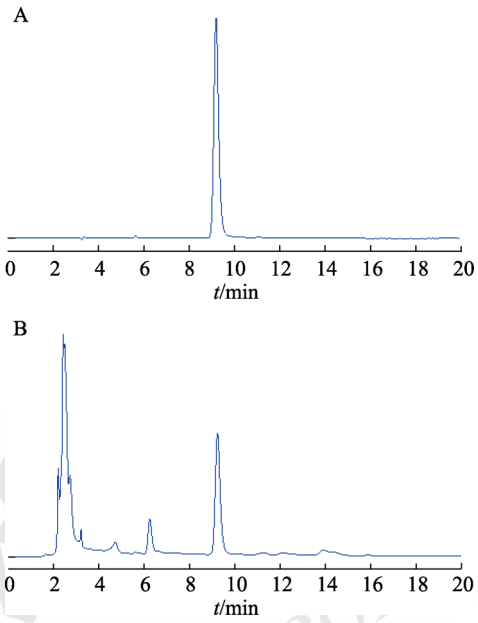

图 1 芍药苷对照品(A)及提取液样品(B)HPLC 图

Fig. 1 HPLC chromatograms of paeoniflorin reference substance(A) and extract sample(B)

2.2.2 标准曲线的制备　精密称取芍药苷对照品 4.50 mg 于 10 mL 棕色量瓶中，加适量流动相溶解，并稀释至刻度，摇匀，即得对照品储备液(每 1 mL 含芍药苷 0.450 mg)。精密量取对照品储备溶液，分别配置 0.090 0，0.157 6，0.225 2，0.337 8 和 0.450 4 mg·mL^{-1} 系列对照品溶液，在转速为 10 000 r·min^{-1} 下离心 10 min，取其上清液，按“2.2.1”项下色谱条件进样分析。以对照品溶液中芍药苷浓度为横坐标 X，峰面积为纵坐标 Y，作标准曲线，得回归方程：Y=14 054X+3.241 3，R^2=1.000 0。即说明在规定的色谱分析条件下，芍药苷浓度在 0.090 0~0.450 4 mg·mL^{-1} 内线性关系良好。

2.2.3 提取液样品芍药苷浓度测定　将冷却的提取药液的续滤液稀释 10 倍后，取 1.0 mL 稀释的药液于离心管中，在转速为 10 000 r·min^{-1} 下离心 10 min，取其上清液，按“2.2.1”项下色谱条件测定芍药苷浓度。

2.2.4 含固量与芍药苷含量的测定　本实验采用

烘干法测定提取液含固量：量取 25 mL 养胃提取液放入已恒重的扁形称量瓶中，于(105±2)℃烘箱中烘干至恒重。提取液含固量计算公式见公式(1)：

$$S=M/V \quad (1)$$

其中 S 为煎煮液含固量(g·mL^{-1})；M 为煎煮液失水后干物质的质量(g)；V 为煎煮液的体积(mL)。

提取工艺一般考察提取效率，很多中成药最终的制剂成品都不是以水溶液的形式存在，而是以称重作为最后的检测标准，即提取液芍药苷含量，其计算公式见公式(2)：

$$C=P\times V/(S\times V) \quad (2)$$

其中 C 为提取液芍药苷含量，g·g^{-1}；P 为提取液芍药苷浓度(g·mL^{-1})；V 为提取液体积(mL)；S 为提取液含固量(g·mL^{-1})。

2.3 实验设计

本实验考察加水温度(X_1)、加水量(X_2)和煎煮温度(X_3)这 3 个主要影响因素对一次提取结果的影响，其中以芍药苷含量作为响应指标(Y)。采用 Box-Behnken 实验设计，各个因素及相应水平见表 1。具体条件见表 2。

表 1 实验设计的因素及水平

Tab. 1 Factors and levels of experimental design

因素	水平		
	−1	0	1
加水温度(X_1)/℃	20	40	60
加水量(X_2)/倍数	2	4	6
煎煮温度(X_3)/℃	80	90	100

表 2 Box-Behnken 实验设计条件及结果

Tab. 2 Conditions and results of Box-Behnken experimental design

编号	工艺参数			响应指标 Y/g·g^{-1}
	X_1/℃	X_2/倍数	X_3/℃	
1	40	6	100	0.119 1
2	60	2	90	0.107 1
3	40	6	80	0.114 7
4	40	2	100	0.175 2
5	20	2	90	0.131 0
6	40	4	90	0.169 5
7	60	4	100	0.119 9
8	20	4	100	0.137 4
9	20	4	80	0.112 5
10	40	4	90	0.166 9
11	60	6	90	0.170 5
12	40	2	80	0.084 5
13	20	6	90	0.175 9
14	60	4	80	0.085 4
15	40	4	90	0.166 7

2.4 数据分析

响应曲面法是一种有效的优化工艺参数的方法，得到的二次多项回归方程不仅精度高，还能分析因素间的交互作用[8-10]。为描述各工艺参数与芍药苷含量的关系，将芍药苷含量设为因变量 Y，将加水温度、加水量、煎煮温度分别设为自变量 X_1、X_2、X_3，采用多项式回归分析方法建立二阶数学模型，其数学模型的基本形式见公式(3)。多项式回归分析计算使用 Minitab 16 软件完成。

$$Y=a_0+a_1X_1+a_2X_2+a_3X_3+a_4X_1X_2+a_5X_1X_3+a_6X_2X_3+a_7X_1^2+a_8X_2^2+a_9X_3^2 \quad (3)$$

其中 $a_{0\sim9}$ 分别表示不同多项式系数。

由响应曲面 3D 图中曲面的倾斜度可以确定两因素对响应值的影响程度，即倾斜度越高，说明两因素的交互作用越显著。3D 图的颜色也可以对影响程度作初步判定[11-12]。此外，等高线形状可以反映交互效应的强弱，椭圆形表示两影响因素交互作用显著，而圆形则与之相反。由等高线可以直观地体现出最优条件下影响因素的取值情况[13]。

3 结果与讨论

3.1 回归模型的建立及显著性检验

芍药苷含量得到的回归模型见公式(4)，其回归模型的方差分析结果见表 3。

$$Y=-14.055\ 7-0.004\ 879\ 05X_1+0.320\ 680X_2+0.277\ 188X_3-0.099\ 037\ 5X_1^2-0.001\ 793\ 07X_2^2-0.080\ 066\ 7X_3^2+0.001\ 193\ 75X_1X_2+0.034\ 875\ 0X_1X_3+0.004\ 315\ 00X_2X_3 \quad (4)$$

表 3 芍药苷提取回归模型的方差分析结果

Tab. 3 ANOVA results in the regression model of paeoniflorin extraction rate

项目	自由度	顺序偏差平方和	调整平均偏差平方和	F	P
回归	9	1.551 80	0.172 422	25.27	0.001
残差误差	5	0.034 11	0.006 822	–	–
失拟	3	0.024 96	0.008 319	1.82	0.374
纯误差	2	0.009 15	0.004 577	–	–
合计	14	1.585 91			

整体模型的 P 值为 0.001，表明该模拟二次方程极其显著，具有统计学意义。失拟项 P 值为 0.374，>0.05，无失拟因素存在。回归方程相关系数 R^2 为 0.978 5，说明拟合的回归关系可以解释因变量(芍药苷含量)97.85%的变异，拟合效果良好。综上参数说明该二次方程可靠，即可用此模型来分析和预测提取工艺芍药苷含量。

通过对提取工艺芍药苷含量回归模型系数的显著性检验，得到不同的 P 值。当 P<0.05，说明该项具有显著的统计学意义，进而辨析各工艺参数对芍药苷提取效果影响的大小。芍药苷提取回归模型的回归系数及方差分析结果见表 4。3 个工艺参数均具有统计学意义，其中线性项中的煎煮温度和加水量极为显著，加水温度具有显著的统计学意义；平方项中的加水温度×加水温度与煎煮温度×煎煮温度具有极显著的统计学意义，其他平方项和交互项的统计学意义不显著；表明各工艺参数对芍药苷提取效果的影响不是简单的线性关系。

表 4 芍药苷提取回归模型的回归系数及方差分析

Tab. 4 Estimated parameter values, determination coefficients and ANOVA results in regression model of paeoniflorin extraction rate

项目	偏回归系数	P
常量	1.717 33	0.000
线性		0.001
加水温度	–0.092 36	0.025
煎煮温度	0.192 92	0.001
加水量	0.243 26	0.000
平方		0.001
加水温度×加水温度	–0.176 07	0.009
煎煮温度×煎煮温度	–0.403 44	0.000
加水量×加水量	–0.080 07	0.122
交互作用		0.357
加水温度×煎煮温度	0.238 70	0.588
加水温度×加水量	0.465 00	0.311
煎煮温度×加水量	0.064 72	0.178

交互项 P 值均>0.05，说明各个工艺参数的交互作用不显著，删除无统计学意义的参数后再次拟合，得到回归模型，结果见公式(5)。

$$Y=-15.574\ 2-0.260\ 852X_1+0.335\ 615X_2+0.723\ 662X_3-0.099\ 037\ 3X_1^2-0.001\ 793\ 07X_2^2-0.080\ 066\ 7X_3^2 \quad (5)$$

由修正后的回归模型可知，加水量(X_2)和煎煮温度(X_3)对芍药苷提取效果的影响较大，即改变加水量和煎煮温度会使芍药苷含量有较大的变化。其整体模型的 P 值为 0.001，各项回归系数 P 值均<0.05，失拟项 P 值>0.05，无失拟因素存在，因此可用该回归方程代替实验真实点对实验结果进行分析。

3.2 芍药苷提取工艺的响应曲面分析

煎煮温度与加水温度、煎煮温度与加水量、加水温度和加水量交互影响对芍药苷含量均显著，且煎煮温度与加水量响应面图更陡峭，即煎煮温度与加水量对芍药苷含量影响最大，结果见图 2。

由图 3 等高线可以看出，加水温度和煎煮温度的交互作用显著，加水量固定为 0 水平时，芍药苷含量随着煎煮温度和加水量的增加而先增加后降低，其中煎煮温度对芍药苷含量的曲线较为陡峭，说明在提取过程中煎煮温度对芍药苷含量的影响大于加水温度。加水量和煎煮温度的交互作用对芍药苷含量的影响效应，当把加水温度固定在 0 水平时，随着煎煮温度的增加芍药苷含量呈先增大后降低的趋势，加水量增加会使芍药苷含量增加。加水温度和加水量的交互作用对芍药苷含量的影响效应，当把煎煮温度固定在 0 水平时，随着加水温度的增加芍药苷含量呈先增大后降低的趋势，加水量增加会使芍药苷含量增加。

3.3 最佳工艺条件及验证

采用响应曲面法优化养胃颗粒的工艺参数见图 4。由图可知，芍药苷提取工艺的最佳工艺条件为加水温度 37.8 ℃，加热温度 94.7 ℃，加水量为药材总质量的 4 倍，此条件下可提取得到芍药苷最大含量 0.192 4 g·g^{-1}。

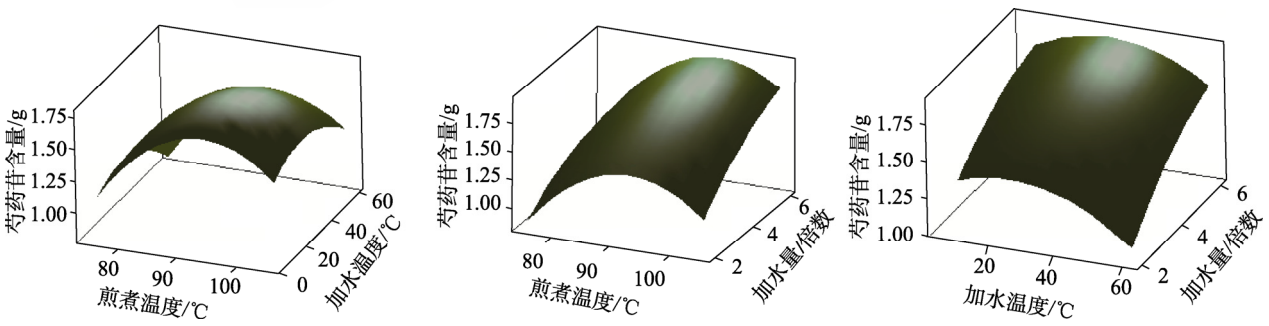

图 2 工艺参数(加水温度、加水量和煎煮温度)对芍药苷含量的响应面图

Fig. 2 Response surface plots between process parameters(water temperature, water volume, and decoction temperature) and paeoniflorin content

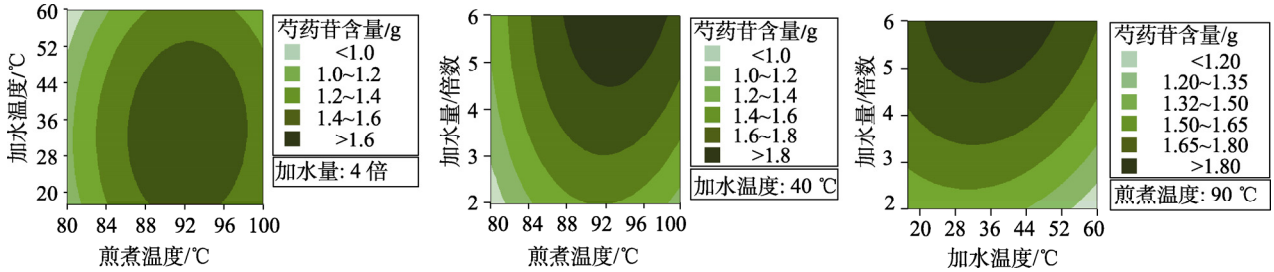

图 3 工艺参数(加水温度、加水量和煎煮温度)对芍药苷含量的等高线图

Fig. 3 Contour plots between process parameters(water temperature, water volume, and decoction temperature) and paeoniflorin content

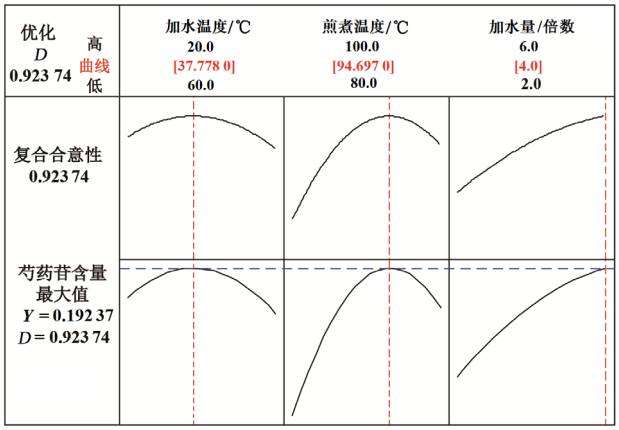

图 4 养胃颗粒提取工艺参数优化图

Fig. 4 Optimized extracting process parameters of Yangwei granules

为检验结果的可靠性，采用上述优化的最佳提取工艺开展实验，实验平行操作 3 次，验证结果见表 5，最终得到的芍药苷平均含量为 0.189 2 g·g^{-1}，与预测值基本吻合。该芍药苷含量值相对于未优化前(以制药厂实际生产工艺条件为基础得到的实验值 0.137 4 g·g^{-1})提高了 37.7%。因此，利用响应曲面法分析得到的养胃颗粒提取工艺参数真实可靠，具有一定的实用价值。

表 5 工艺验证实验结果

Tab. 5 Results of process verification

实验序号	芍药苷含量/g·g^{-1}	预测值/g·g^{-1}	绝对偏差	RSD/%
1	0.193 5		0.001 1	
2	0.186 2	0.192 4	−0.006 2	2.0
3	0.188 0		−0.004 4	

4 讨论

目前养胃颗粒在国内医药市场上已得到广泛应用，提高和优化提取纯化工艺，对提升养胃颗粒终产品具有重要意义。本实验利用响应曲面法发现煎煮温度和加水量对芍药苷的提取率具有极显著的影响，加水温度也能影响芍药苷的提取率。所建立的模型能够较好地预测提取结果。最后确定提取工艺最佳条件：加水温度 35 ℃，煎煮温度 94.7 ℃，加水量为药材总质量的 4 倍，理论芍药苷含量可达到 0.192 4 g·g^{-1}。采用优化条件实际操作得到的芍药苷平均含量为 0.189 2 g·g^{-1}，接近理论值。该数值相对于未优化前(制药厂实际生产工艺条件)提高了 37.7%。

本研究主要探讨了养胃颗粒中不同提取工艺参数对芍药苷含量的影响，但养胃颗粒作为中药复方制剂，其有效成分尚不明确[14-15]，其质量指标，即工艺优化目标有待作更深入的研究和探讨。

REFERENCES

[1] WANG J, SHAO Q, QU H B, et al. HPLC determination of four active components in Sugar-free YanWei Granules[J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2006, 26(12): 1804-1806.

[2] MA H F, KE J D, NI W G. Observation of the curative effect of Yangwei granules treatment for chronic atrophic gastritis with intestinal metaplasia[J]. Chin Arch Tradit Chin Med(中华中医药学刊), 2015, 33(6): 1429-1431.

[3] YIN X, SUN P, WEN X S. Research on factors affecting about the content of paeoniflorin in Radix paeoniae alba[J]. J Liaoning Univ Tradit Chin Med(辽宁中医药大学学报), 2016, 18(2): 78-80.

[4] 中国药典. 一部[S]. 2020: 1386.

[5] 余小翠, 刘高峰. 响应面分析法在中药提取和制备工艺中的应用[J]. 中药材, 2010, 33(10): 1651-1655.

[6] YIN M Y, LIU S X, ZHANG T J, et al. Overview of extracting technique of compound Chinese materia medica[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2015, 46(21): 3279-3283.

[7] GUO M M. Analysis of the effect of traditional Chinese medicine extraction process on drug quality[J]. Heilongjiang Sci(黑龙江科学), 2016, 7(12): 130-131.

[8] HUANG K H, AKOH C C. Optimization and scale-up of enzymatic synthesis of structured lipids using RSM[J]. J Food Sci, 1996, 61(1): 137-141.

[9] HUANG H, ZENG L J, MO Y C, et al. Optimization of ultrasonic extraction of total flavonoids from *Coreopsis tinctoria* nutt. using response surface methodology[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2015, 32(8): 947-951.

[10] ZHAO X Y. Optimization of extraction of total flavonoids from *Salvia miltiorrhiza* bge. by response surface analysis and evaluation of its antioxidant activity *in vitro*[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2017, 34(5): 686-691.

[11] HE G Y, ZHOU M D, TONG S Q, et al. Optimizing process of Radix Salvia Miltiorrhiza ethanol precipitation by response surface methodology[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2010, 27(2): 118-122.

[12] SHI Z, WANG J P, ZHANG J J, et al. Optimizing the extraction process of the total saponin of dioscoreae nipponicae rhizoma by response surface methodology[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2017, 34(1): 68-71.

[13] SONG Y, RAN S, SUN F F, et al. Optimization of processing technology of Momordicae Semen cream by Box-Behnken design-response surface methodology[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2019, 50(2): 382-387.

[14] ZHOU B G, MEI Y Z, YAN X L, et al. Systematic review and Meta-analysis of efficacy and safety of Yangwei Granules for chronic gastritis[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2020, 45(20): 5008-5016.

[15] ZHAO J, TIAN G, QIU Y Y, et al. Rapid quantification of active pharmaceutical ingredient for sugar-free Yangwei granules in commercial production using FT-NIR spectroscopy based on machine learning techniques[J]. Spectrochimica Acta Part A: Mol Biomol Spectrosc, 2021(245): 118878. Doi: 10.1016/j.saa.2020.118878.

收稿日期：2021-03-23

(本文责编：陈怡心)

http://www.chinjmap.com