

# 女贞子酒制工艺响应曲面法的优化

刘艳红 杨欣澜

(陕西国际商贸学院,咸阳,712046)

**摘要** 目的:探讨利用响应曲面法优化女贞子酒制工艺条件。方法:在单因素实验的基础上,选取黄酒用量、闷润时间和蒸制时间为自变量,以齐墩果酸含量为响应值,应用中心组合设计实验方法,研究各自变量及其交互作用对齐墩果酸含量的影响,建立二次多项回归方程的数学模型。结果:最终优选的女贞子酒制工艺为:黄酒用量 25.19%,闷润时间 3.06 h,蒸制时间 5.16 h,在此条件下,齐墩果酸含量的理论值为 1.65035%。结论:响应曲面法建立的数学模型和实验观察数据相符,优化的女贞子炮制工艺方法简便,有效成分含量高。

**关键词** 女贞子;炮制;齐墩果酸

## Optimization of Streamed Processing Technology of Fructus Ligustri Lucidi with Rice Wine by Response Surface Methodology

Liu Yanhong, Yang Xinlan

(Shaanxi Institute of International Trade &amp; Commerce, Xianyang 712046, China)

**Abstract Objective:** To optimize the processing technology of Fructus Ligustri Lucidi using response surface methodology. **Methods:** On the basis of single factor experiment, wine content, soaking time and steaming time as independent variables, with the content of Oleanolic Acid as the response value, central composite experimental design method was applied to study the effects of these variables and their interactions on the content of Oleanolic Acid, and then the mathematical model of two multinomial regression equation was established. **Results:** The final optimization of streamed processing technology of Fructus Ligustri Lucidi with rice wine was wine content 25.19%, soaking time 3.06 h, steaming time 5.16 h. Under this condition, the theoretical value of the content of Oleanolic Acid was 1.65035%. **Conclusion:** The mathematical model established by response surface method matches the experiment observation data. The optimized Fructus Ligustri Lucidi processing craft method is simple with high effective constituents content.

**Key Words** Fructus Ligustri Lucidi; Processing; Oleanolic Acid

中图分类号:R282.4 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2018.01.052

女贞子系木犀科植物女贞 *Ligustrum lucidum* Ait 的干燥成熟果实,始载于《神农本草经》,列为上品。其性味甘、苦、凉,归肝、肾经。具有滋肾补肝,明目乌发的功能。常用于治疗眩晕耳鸣,腰膝酸软,须发早白,目暗不明等症<sup>[1]</sup>,现代研究表明,女贞子提取物具有降血糖、抗氧化作用,其提取物对糖尿病大鼠肝损伤具有一定保护作用<sup>[2-4]</sup>,以上发现将为扩大女贞子的临床应用提供一定的依据。

女贞子的炮制方法始见于宋代·《疮疡》一书,随着历史的发展,炮制方法不断增加,沿用至今。现在女贞子的炮制方法,除了净制、蒸制、酒制、盐制外,还有醋制,全国各地的炮制规范中记载的大多是酒制<sup>[5]</sup>。1963和1977年版《中华人民共和国药典》均记载为酒炖法,1985—2015年版《中华人民共和国药典》记载为酒炖法或酒蒸法,用酒量为每100 kg女贞子用酒20 kg<sup>[6]</sup>。

查阅文献及各地炮制规范,发现关于女贞子的炮制的方法及工艺各地各法,闷润时间、蒸制时间的工艺参数也不完备。目前,女贞子药材主要采用酒制,炮制过程中在药材是否闷润、蒸制时间及蒸制温度上,2015版《中华人民共和国药典》和全国各省市的中药饮片炮制规范,均没有明确规定,即便是有规定,参数也不统一,各地各法<sup>[7-11]</sup>,如此情况饮片质量必然受到影响,饮片的优劣,直接影响着中医治疗的疗效<sup>[12]</sup>,因此,规范女贞子酒制工艺意义重大。本实验中,选取评价指标为女贞子酒制品中齐墩果酸的含量<sup>[13]</sup>,采用 Box-Behnken 优化女贞子酒制工艺,确定最佳的酒制工艺参数,为饮片炮制工艺及药材质量的可控性提供依据。

### 1 仪器与试药

1.1 仪器 Waters E2695 高效液相色谱仪(Waters 科技上海有限公司),TE124S 分析天平(北京赛多利

斯天平有限公司), CP225D 电子分析天平(北京赛多利斯天平有限公司), SHZ-D(Ⅲ)循环水式真空泵(巩义市予华仪器有限责任公司), FW-100D 高速万能粉碎机(天津鑫博得仪器有限责任公司), KQ-A 玻璃仪器气流烘干机(北京中兴伟业仪器有限公司), KH5200DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 试剂 齐墩果酸对照品(购于食品药品检定研究院,批号:110709-201206);氯仿、甲醇、磷酸溶液等其他试剂均为分析纯,实验用水为蒸馏水。

1.3 分析样品 女贞子(采摘于陕西国际商贸学院,经生药教研室雷国莲教授鉴定为木犀科植物女贞的干燥成熟果实)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱 Kromasil C<sub>18</sub>(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 流动相: 甲醇-0.1% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 溶液梯度洗脱(0~5 min 85:15; 5~14.5 min 90:10; 14.5~18 min 91:9; 18~25 min 95:5), 流速为 1 mL/min, 测定波长 210 nm, 柱温 25 ℃。

2.2 对照品溶液的制备 精密称取齐墩果酸对照品 13.07 mg, 置 25 mL 容量瓶中, 加甲醇定容至刻度, 配制成浓度为 0.522 8 mg/mL 对照品溶液。

2.3 供试品溶液制备 精密称取经干燥、粉碎后过 60 目筛的女贞子粉末 0.5 g, 置 50 mL 具塞锥形瓶中, 精密加氯仿 25 mL, 称重, 超声波处理 30 min, 取出, 放冷, 再称重, 用氯仿补足减失的质量, 摇匀, 过滤, 即得。

2.4 齐墩果酸标准曲线的绘制 取 0.522 8 mg/mL 的对照品溶液, 分别进样 2 μL、4 μL、8 μL、10 μL、16 μL、20 μL, 按上述色谱条件测定峰面积。以峰面积(A)对齐墩果酸进样量(μg)进行线性回归, 回归方程为  $y = 573\ 784x + 55\ 174$  ( $R^2 = 0.999\ 5$ ), 表明齐墩果酸在 1.05~10.46 μg 范围内具有良好的线性关系。标准曲线见图 1。

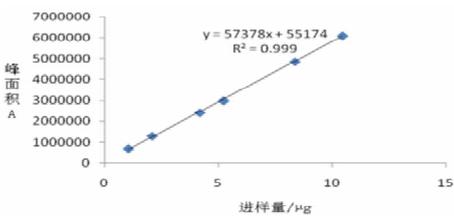


图 1 齐墩果酸的标准曲线

2.5 单因素考察 黄酒用量、闷润时间和蒸制时间 3 个因素对齐墩果酸含量的影响<sup>[14-15]</sup>。

2.5.1 黄酒用量对齐墩果酸含量的影响 精密称取女贞子 25 g, 分别加入药材量 15%、20%、25%、

30%、35%、40% 的黄酒, 闷润 1 h, 蒸制 3 h, 取出, 摊于瓷盘中, 烘箱中 50 ℃ 烘干, 取出, 放凉, 粉碎, 按上述制样和色谱方法测定其中齐墩果酸含量。黄酒用量为 15%~25% 内时, 随着黄酒用量的增加, 炮制品中齐墩果酸含量增加, 但随着黄酒用量继续增加, 炮制品中齐墩果酸含量反而降低, 这可能是因为随着黄酒用量的增加, 药材会出现伤水, 齐墩果酸流失。见图 2。

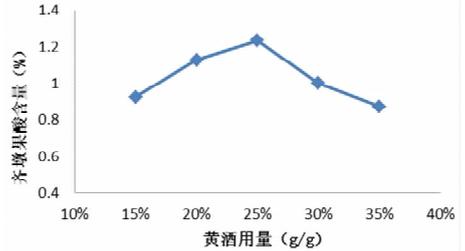


图 2 黄酒用量对齐墩果酸含量的影响

2.5.2 闷润时间对齐墩果酸含量的影响 精密称取女贞子 25 g, 加入药材量 25% 的黄酒, 分别闷润时间 1、2、3、4、5 h, 蒸制时间 3 h, 取出, 摊于瓷盘中, 烘箱中 50 ℃ 烘干, 取出, 放凉, 粉碎, 按上述制样和色谱方法测定其中齐墩果酸含量。闷润时间为 1~3 h 内时, 随着闷润时间的延长, 炮制品中齐墩果酸含量增加, 但随着闷润时间继续增加, 炮制品中齐墩果酸含量基本不变, 考虑节约时间选择闷润时间为 3 h。见图 3。

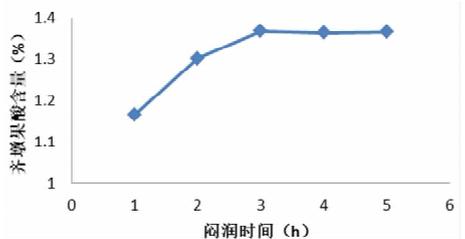


图 3 闷润时间对齐墩果酸含量的影响

2.5.3 蒸制时间对齐墩果酸含量的影响 精密称取女贞子 25 g, 加入药材量 25% 的黄酒, 闷润时间 3 h, 蒸制时间 1、3、5、7、9 h, 取出, 摊于瓷盘中, 烘箱中 50 ℃ 烘干, 取出, 放凉, 粉碎, 按上述制样和色谱方法测定其中齐墩果酸含量。蒸制时间为 1~5 h 内时, 随着蒸制时间的延长, 炮制品中齐墩果酸含量增加, 说明蒸制过程有利于齐墩果酸的溶出, 但随着蒸制时间继续增加, 炮制品中齐墩果酸含量基本不变或略有下降, 可能随着蒸制时间延长有些成分分解。见图 4。

2.6 响应曲面优化

2.6.1 响应曲面优选分析 在单因素的实验的基础上, 根据 Box-Behnken 的设计原理, 选择黄酒用

量、闷润时间以及蒸制时间为实验的影响因素,以齐墩果酸含量为响应值,采用三因素三水平进行实验结果分析。在单因素实验的基础上,根据因素水平表1,按照响应曲面 Box-Behnken 的设计原理,共有17组实验,其实验结果如下表2~3。

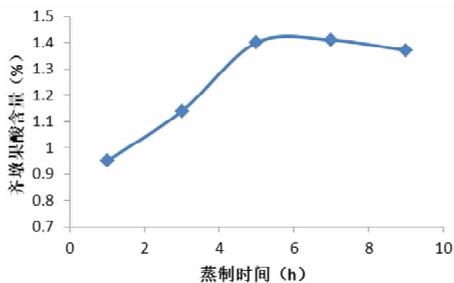


图4 蒸制时间对齐墩果酸含量的影响

表1 因素水平

编号	黄酒用量(%)	闷润时间(h)	蒸制时间(h)
1	30	4	7
0	25	3	5
-1	20	2	3

表2 实验设计及实验结果

编号	黄酒用量 ( $X_1$ %)	闷润时间 ( $X_2$ h)	蒸制时间 ( $X_3$ h)	提取率 (%)
1	1	1	0	1.127
2	1	0	1	1.093
3	0	0	0	1.645
4	0	1	-1	1.351
5	-1	0	1	1.320
6	0	-1	-1	1.219
7	-1	1	0	1.349
8	1	-1	0	1.434
9	0	0	0	1.650
10	0	0	0	1.690
11	0	0	0	1.683
12	0	0	0	1.568
13	1	0	-1	1.329
14	0	-1	1	1.342
15	0	1	1	1.389
16	-1	-1	0	1.029
17	-1	0	-1	0.936

通过 Design-Expert8.0.6 软件对所得数据进行多元回归拟合,得到齐墩果酸含量( $Y$ )对女贞子炮制中黄酒用量( $X_1$ ),闷润时间( $X_2$ ),蒸制时间( $X_3$ )的二次多元回归方程是: $Y = 1.65 + 0.044X_1 + 0.024X_2 + 0.039X_3 - 0.16X_1X_2 - 0.16X_1X_3 - 0.021X_2X_3 - 0.28X_1^2 - 0.13X_2^2 - 0.19X_3^2$ 。

回归方程的  $R^2 = 0.9851$ ,表明实验值与预测值有很好的拟合度。且失拟项不显著,表明方程的模拟好,可以采用这种方法对女贞子的酒制工艺进行

预测和分析。从回归方程显著性检查结果显示:回归方程的一次项中,黄酒用量( $X_1$ )、蒸制时间( $X_3$ )对齐墩果酸含量的影响显著,而闷润时间的一次项不显著;在交互项中,黄酒用量和闷润时间( $X_1X_2$ )、黄酒用量和蒸制时间( $X_1X_3$ )的交互项具有非常显著影响,其他无显著性;二次项中,黄酒用量( $X_1^2$ )、闷润时间( $X_2^2$ )、蒸制时间( $X_3^2$ )均具有非常显著性。在各个因素的水平中,对齐墩果酸含量影响结果由大到小的顺序为黄酒用量( $X_1$ ) > 蒸制时间( $X_3$ ) > 闷润时间( $X_2$ )。见表3。

表3 方差分析表

方差来源	平方和	自由度	均方	F	F	P
Model	0.85	9	0.095	51.43	<0.0001	<0.01
$X_1$	0.015	1	0.015	8.26	0.0238	<0.05
$X_2$	0.0046	1	0.0046	2.50	0.1578	
$X_3$	0.012	1	0.012	6.48	0.0384	<0.05
$X_1X_2$	0.098	1	0.098	53.33	0.0002	<0.01
$X_1X_3$	0.096	1	0.096	52.15	0.0002	<0.01
$X_2X_3$	0.0018	1	0.0018	0.98	0.3552	<0.01
$X_1^2$	0.34	1	0.34	184.40	<0.0001	<0.01
$X_2^2$	0.069	1	0.069	37.64	0.0005	<0.01
$X_3^2$	0.16	1	0.16	85.63	<0.0001	
残差	0.013	7	0.0018			
失拟项	0.0035	3	0.0012	0.50	0.7040	不显著
纯误差	0.0094	4	0.0024			
总和	0.87	16	$R^2 = 0.9851$			

2.6.2 响应曲面图谱与分析 根据模型方程绘制的响应曲面图与等高线图见图5~7。从图5~7可以直观地看出三因素的最佳参数及各因素之间的交互作用。图5表示黄酒用量以及闷润时间及其交互作用对齐墩果酸含量的影响,从图中可见,黄酒用量曲面较陡峭,说明黄酒用量对齐墩果酸含量的影响较显著,闷润时间的曲面较平缓,说明闷润时间对齐墩果酸含量的影响不明显<sup>[16]</sup>。等高线图为椭圆形,说明黄酒用量和闷润时间的交互项对齐墩果酸含量影响显著。黄酒用量和蒸制时间对齐墩果酸含量的影响见图6,黄酒用量和蒸制时间曲面均较陡峭,说明黄酒用量和蒸制时间对齐墩果酸含量的影响较显著,等高线图为椭圆形,说明黄酒用量和蒸制时间的交互项对齐墩果酸含量影响显著。图7为闷润时间与蒸制时间对齐墩果酸含量的响应曲面图,由图可以看出当黄酒用量一定时,齐墩果酸含量都是随着闷润时间与蒸制时间的增加呈现先增加后降低的趋势,闷润时间与蒸制时间的坡面都较陡,则说明它们的二次项对齐墩果酸含量的影响都比较显著。等高线趋于椭圆,但不明显,说明闷润时间与蒸制时间的交互项对齐墩果酸含量的影响不显著。

根据实验设计所得出的结果以及二次回归模型

的数学分析结果,使用 Design-Expert 8.0.6 软件计算可得到女贞子酒制工艺的炮制条件为黄酒用量 25.19%,闷润时间 3.06 h,蒸制时间 5.16 h,齐墩果酸含量的理论值为 1.650 35%。

为了验证响应曲面法所得结果以及其可实施性,通过实验对优化后炮制工艺条件进行确定。对最佳提取工艺的参数而进行调整,达到方便操作的要求,最终工艺条件调整为黄酒用量 25%,闷润时间 3.1 h,蒸制时间 5.2 h。在此条件做 3 次平行实验,得到齐墩果酸的平均含量为 1.64%。本实验研究为进一步有效、合理的对女贞子药材进行酒制提供参考依据,将在一定程度上保证女贞子炮制品品质的稳定性。

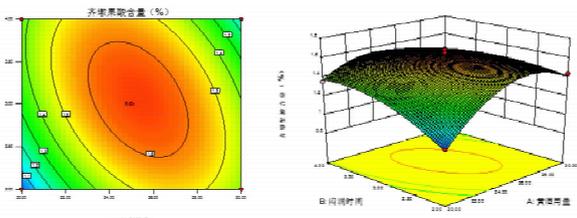


图 5 黄酒用量与闷润时间的响应曲面图和等高线图

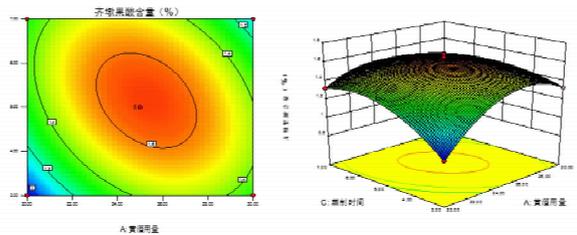


图 6 黄酒用量与蒸制时间的响应曲面图和等高线图

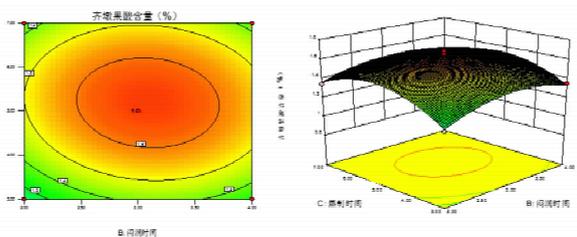


图 7 闷润时间与蒸制时间的响应曲面图和等高线图

**2.7 结果分析** 本实验通过响应曲面法考察了黄酒用量、闷润时间、蒸制时间对女贞子炮制品中齐墩果酸含量的影响。二次方程的模型回归差异极显著,且二次方差分析后的失拟项检验不显著,说明本实验所建立的二次回归方程正确反映了所考察因素与响应值之间的关系,试验设计科学合理;利用回归模型对影响齐墩果酸含量的关键因素及其相互作用进行了探讨;通过工艺条件的优化得到女贞子的酒制最佳炮制工艺条件为黄酒用量 25.19%,闷润时间 3.06 h,蒸制时间 5.16 h,在此条件下,齐墩果酸含量的理论值为 1.650 35%。为了方便操作,对最

佳提取工艺的参数进行调整,最终工艺条件调整为黄酒用量 25%,闷润时间 3.1 h,蒸制时间 5.2 h。在此条件做 3 次平行实验,得到齐墩果酸的平均含量为 1.64%,相对误差为 0.63%,与预测值接近。

**3 讨论**

本实验在建立 HPLC 法测定女贞子中齐墩果酸的含量测定方法过程中,为了使齐墩果酸和女贞子中其他成分良好分离,探索采用了梯度洗脱的方法,最终使齐墩果酸与其他成分实现了较好的分离。

炮制工艺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<sup>[17]</sup>,不能完全作为大生产的参考。响应曲面法能把因素与响应值的相互关系函数化,建立连续变量曲面模型,对各因素进行了全面的优化研究,比正交试验设计更直观、精确地得到最优组合条件<sup>[18-19]</sup>。由此得到更优的女贞子炮制工艺条件,为女贞子药材质量和品质的可控性提供保证。因此,该炮制方法可以在女贞子的炮制工艺研究及生产中推广应用。

**参考文献**

- [1] 江苏新医学院. 中药大辞典[M]. 上海:上海人民出版社,1977: 237-239.
- [2] 王利萍,王琛,赵艳红,等. 女贞子提取物对糖尿病大鼠早期肝损伤的干预研究[J]. 中华中医药学刊,2017,35(1):236-238,288.
- [3] 苏慧,姚永琴,李志毅,等. 女贞子抗 CCl4 致小鼠肝损伤的作用机制研究[J]. 华西药学杂志,2017,32(1):47-48.
- [4] 赵岩,徐莹,查琳,等. 女贞子提取物降血糖及抗氧化活性的研究[J]. 药物评价研究,2016,39(3):382-387.
- [5] 中华人民共和国药政管理局. 全国中药炮制规范[S]. 北京:人民卫生出版社,1988:118.
- [6] 卫生部药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 北京:化学工业出版社,2015:43.
- [7] 上海市卫生局. 上海市中药饮片炮制规范[S]. 上海:上海科学技术出版社,1980:105.
- [8] 广东省卫生厅. 广东省中药炮制规范[S]. 广州:广东科技出版社,1984.
- [9] 安徽省食品药品监督管理局. 安徽省中药饮片炮制规范(2005版)[S]. 合肥:安徽科学技术出版社,2006:564.
- [10] 山东省药品监督管理局. 山东省中药炮制规范(2002版)[S]. 济南:山东友谊出版社,2003:152.
- [11] 江苏省卫生局. 江苏省中药饮片炮制规范(1980版)[S]. 南京:江苏科学技术出版社,1980:261.
- [12] 秦昆明,方前波,蔡宝昌. 中药饮片规范化炮制过程中存在的问题及对策[J]. 世界中医药,2009,4(4):183-185.
- [13] 燕霞,何颂华,谢培德. HPLC-CAD 法测定女贞子中齐墩果酸和熊果酸的含量[J]. 中国民族民间医药,2017,26(10):12-14,21.
- [14] 刘艳红,杨欣澜. 正交试验法优化女贞子炮制工艺研究[J]. 黑龙江科技信息,2016(31):25-26.

- [15] 李慧, 刘其南, 张丽, 等. 基于层次分析法及多指标正交试验优选酒炖女贞子炮制工艺[J]. 中草药, 2016, 47(16): 2832-2837.
- [16] 王月茹, 谢伟, 张建, 等. 星点设计-响应面分析法优选陕产铁筷子皂苷提取工艺[J]. 世界中医药, 2014, 9(12): 1666-1668.
- [17] 吴琳, 彭欣, 孙芳, 等. 星点设计-效应面优化法与中药学实验研究[J]. 山东中医药大学学报, 2014, 38(6): 582-585.

- [18] 王璐珊, 吴士龙, 王森, 等. 响应曲面法优化金花葵种子中黄酮的提取工艺[J]. 中国现代中药, 2016, 18(7): 907-912.
- [19] 秦楠, 缪文玉, 连文绮, 等. 响应曲面法优化微波辅助提取香菇柄多糖及其抗氧化活性研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2017, 8(2): 594-600.

(2017-01-12 收稿 责任编辑: 杨觉雄)

## 世界中联第十届中医儿科国际学术交流大会 世界中联儿科专业委员会换届改选会议 通知

经世界中医药学会联合会批准, 世界中联第十届中医儿科国际学术交流大会将于 2018 年 7 月在新加坡(7. 21 - 7. 23)、马来西亚(7. 24 - 7. 28) 召开。会议由世界中医药学会联合会儿科专业委员会、新加坡中医研究院联合主办。

世界中联儿科专业委员会第二届理事会任期已届满, 本次会议期间将同时召开儿科专业委员会换届改选会议, 产生第三届理事会。本次改选工作将按照世界中联专业委员会章程要求, 在海内外中医儿科同行中广泛发动, 按条件遴选产生新一届理事会。通知如下:

### 一、大会主题

中西医儿科团结合作, 为各国儿童健康服务

### 二、会议内容

助力一带一路建设, 推进中医儿科国际学术交流与合作

在新加坡、马来西亚两国举办世界中联第十届中医儿科国际学术交流大会召开世界中联儿科专业委员会换届改选会议

### 三、征文内容

1. 著名中医西医儿科专家学科前沿学术报告
2. 儿科热点疾病的临床与实验研究成果报告
3. 外治疗法推拿疗法针灸疗法儿科临床应用

### 4. 面向国际的循证性中医临床诊疗指南研究

### 5. 中医儿科医疗、教学、科研工作经验交流

### 四、征文要求

见《儿科通讯》78 期。

### 五、会议日程

7 月 21 日报到, 20:00 - 21:30 儿科专业委员会换届改选会

7 月 22 - 23 日第十届中医儿科国际学术交流大会新加坡学术交流、访问

7 月 24 - 27 日第十届中医儿科国际学术交流大会马来西亚学术交流、访问

7 月 28 日返程

### 六、会议费用

注册费: 新加坡代表每人 150 新元; 中国及其他国家地区代表每人: 300 新元, 或人民币 1500 元。差旅正联系旅行社办理。以上两项费用交付办法待通知。往返机票自购。

### 七、联系方式

联系人: 戴启刚(中国): 86 - 18112938805

Sally Koh(新加坡): 65 - 97973096, 联系邮箱: szlek@126.com

世界中医药学会联合会儿科专业委员会

2017. 12. 14