

响应面法优化酒蒸南五味子炮制工艺

崔春利,寇欢,董媛媛,张化为,邓翀*

(陕西中医学院药学院,陕西 咸阳 712046)

[摘要] 目的:优选酒蒸南五味子的炮制工艺参数。方法:以皂苷类、木脂素类及多糖类成分含量的综合评分为因变量,运用 Box-Behnken 试验考察加酒量、闷润时间、蒸制时间对酒蒸南五味子炮制工艺的影响,运用 Design Expert 8.05 软件对试验数据进行分析,建立综合评分与各自变量的多元二次回归方程的数学模型,通过响应面分析确定工艺参数。采用 UV 测定各指标成分含量,检测波长分别为 540,560,484 nm。结果:最佳酒蒸工艺参数为每 100 g 药材加酒量 11 g,闷润时间 1 h,蒸制时间 6.5 h;皂苷类、木脂素类及多糖类成分的质量分数平均值分别为 6.386%,12.297%,4.659%,RSD 分别为 2.31%,3.22%,1.46%;综合评分 95.58,与理论预测值(96.28)偏差 0.72%。结论:从多化学组分含量综合评分优选的炮制工艺能更科学、合理地控制酒蒸南五味子的饮片质量。

[关键词] 南五味子;酒蒸工艺;Box-Behnken 响应面分析;人参皂苷 Re;五味子酯甲;D-无水葡萄糖

[中图分类号] R283.6;R283.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)18-0009-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014180009

Optimization of Rice Wine Steaming Process of Schisandrae Sphenantherae Fructus with Response Surface Methodology

CUI Chun-li, KOU Huan, DONG Yuan-yuan, ZHANG Hua-wei, DENG Chong*

(College of Pharmacy, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xi'an 712046, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize rice wine steaming process of Schisandrae Sphenantherae Fructus. **Method:** According to contents of saponins, lignans, polysaccharides from Schisandrae Sphenantherae Fructus in composite score for index, Box-Behnken experimental design was adopted to investigate effects of wine content, soaking time and steaming time on processing technology, experimental data analysis was disposed by Design Expert 8.05 software, multivariate quadratic regression equation mathematical model between composite score and independent variables was established, then determined technical parameters by response surface methodology. UV was employed to determine contents of index components with detection wavelength of 540, 560, 484 nm, respectively. **Result:** Optimal processing parameters were as follows: added 11 g of wine for per 100 g of herbs, soaking time of 1 h, steaming time of 6.5 h; average contents of saponins, lignans and polysaccharides were 6.386%, 12.297% and 4.659% with RSD of 2.31%, 3.22% and 1.46%, respectively; composite score was 95.58 with deviation of 0.72% by comparing with the theoretical prediction value of 96.28. **Conclusion:** This optimized process can scientifically and reasonably control quality of Schisandrae Sphenantherae Fructus pieces.

[Key words] Schisandrae Sphenantherae Fructus; rice wine steaming process; Box-Behnken response surface analysis; ginsenoside Re; schisantherin A; D-anhydrous glucose

南五味子性温,味酸,功效收敛固涩、益气生津、补肾宁心^[1]。其生品以敛肺止咳止汗为主,酒制后

[收稿日期] 20140119(013)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30902002,81374028);陕西省中医药管理局项目(13-ZY014);陕西省重点科技创新团队计划项目(2013KCT-26)

[通讯作者] *邓翀,博士,副教授,从事中药炮制化学及中药炮制原理研究,Tel:029-38185165,E-mail:fmudz217@126.com

益肾固精作用增强,常用于治疗肾虚遗精^[2]。南五味子传统蒸制方法以酒蒸和醋蒸为主,其炮制工艺参数如辅料量、闷润时间、蒸制时间均无统一的标准^[3]。目前关于醋制南五味子研究的报道较多,而酒蒸南五味子炮制工艺的研究报道较少,且评价指标较为单一^[4],忽视了其他成分在炮制过程中的含量变化。本实验拟选择皂苷类、木脂素类及多糖类成分含量的综合评分为指标,通过响应面法优化酒蒸南五味子的炮制工艺,为南五味子酒制饮片的质量控制提供参考。

1 材料

ISO9001 型电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司),SK-1 型快速搅拌器(上海沪西分析仪器有限公司),UV1102 型紫外-可见分光光度计(上海天美科学仪器有限公司)。南五味子购于西安万寿路药材市场,经陕西中医学院生药教研室王继涛高级实验师鉴定为木兰科植物华中五味子 *Schisandra sphenanthera* Rehd. et Wils. 成熟果实;黄酒(绍兴县第三酒厂),人参皂苷 Re,五味子酯甲及 D-无水葡萄糖对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为 110754-200822, 11529-200503, 110833-200503),试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备 分别精密称取干燥至恒重的人参皂苷 Re,五味子酯甲及 D-无水葡萄糖对照品 2.04,5.05,2.24 mg,依次置于 10,5,10 mL 量瓶中,加甲醇溶解并定容至刻度,摇匀,即得。

2.2 供试品溶液的制备 精密称取南五味子炮制品粉末(过 60 目筛)约 1 g,加 16 倍量 55% 乙醇提取 2 次,每次 60 min,滤过,提取液在 80 °C 水浴浓缩,挥干,加 55% 乙醇溶解并定容于 25 mL 量瓶中,即得,于 4 °C 冷藏待用^[5]。

2.3 方法学考察

2.3.1 标准曲线绘制 精密量取人参皂苷 Re 对照品溶液 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6 mL, 分别置于 10 mL 试管中,于 95 °C 水浴蒸干,加入 5% 香草醛-冰乙酸 0.2 mL 和高氯酸 0.8 mL,利用 SK-1 型快速搅拌器混匀,于 70 °C 水浴中放置 15 min,取出,冰浴 5 min,加入冰乙酸 4 mL,混匀^[6]。以不加对照品的溶液为空白,在 540 nm 处测定吸光度(A),以质量浓度(C)为横坐标,A 为纵坐标,得回归方程 $A = 4.215C + 0.005$ ($R^2 = 0.9992$),线性范围 0.047 0 ~ 0.142 4 mg。精密量取五味子酯甲对照品溶液 0, 0.03, 0.05, 0.07, 0.09, 0.12 mL, 分别置于 10 mL 试

管中,各加入变色酸 0.5 mL 和浓硫酸 3 mL,加水定容至 5 mL,混匀,于 98 °C 水浴中加热 30 min,取出冰浴 10 min,在 560 nm 处测定 A^[7],得回归方程 $A = 6.6694C - 0.0012$ ($R^2 = 0.9997$),线性范围 0.030 3 ~ 0.121 2 mg。精密量取 D-无水葡萄糖对照品溶液 0, 0.05, 0.10, 0.15, 0.20, 0.25, 0.30, 0.35, 0.40 mL, 分别置于 10 mL 试管中,加水定容至 1 mL,摇匀,各加入 4% 苯酚-水溶液 1 mL,摇匀,迅速加入浓硫酸 5 mL,摇匀,置于 40 °C 水浴中保温 30 min,取出,冰水浴中放置 5 min,取出^[8],于 484 nm 处测定 A,得回归方程 $A = 8.0261C + 0.0639$ ($R^2 = 0.9960$),线性范围 0.011 2 ~ 0.089 6 mg。

2.3.2 精密度试验 精密吸取人参皂苷 Re、五味子酯甲、D-无水葡萄糖对照品溶液 0.4, 0.12, 0.2 mL, 分别置于 10 mL 试管中,按 2.3.1 项下方法分别加入不同显色剂,平行测定 6 次 A,计算 RSD 分别为 0.19%, 0.06%, 0.09%, 表明仪器精密度良好。

2.3.3 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液 0.05, 0.05, 0.15 mL, 分别置于 10 mL 试管中,按 2.3.1 项下方法分别加入不同显色剂,于 10, 20, 30, 40, 50 min 后测定,计算人参皂苷 Re、五味子酯甲、D-无水葡萄糖 A 的 RSD 分别为 1.04%, 0.61%, 0.54%, 表明供试品溶液中皂苷类、木脂素类、多糖类成分在 1 h 内稳定性良好。

2.3.4 重复性试验 取同一南五味子炮制品粉末 3 组,每组共 5 份,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,每组的取样量分别为 0.05, 0.05, 0.15 mL, 按 2.3.1 项下方法测定 A,计算皂苷类、木脂素类及多糖类成分的 RSD 分别为 3.50%, 1.69%, 5.71%, 表明该方法重复性较好。

2.3.5 加样回收率试验 取同一南五味子炮制品粉末 3 组,每组共 5 份,按 2.2 项下制备供试品溶液,分别精密加入人参皂苷 Re、五味子酯甲、D-葡萄糖对照品溶液 0.2 mL,依次精密吸取各组溶液 0.05, 0.05, 0.15 mL, 按 2.3.1 项下显色方法处理,计算加样回收率分别为 (97.345 ± 1.368)%, (98.091 ± 2.874)%, (101.428 ± 2.385)%, RSD 分别为 1.66%, 1.13%, 1.98%, 表明该方法具有较好的可行性。

2.4 炮制工艺优选 在预试验基础上,选择加酒量、闷润时间、蒸制时间为自变量,采用 Design Expert 8.05 软件 Box-Behnken 试验的三因素三水平设计法,总共设定 17 组炮制试验点,因素水平见

表 1。称取 17 份南五味子药材,每份 100 g,以皂苷类、木脂素类及多糖类成分含量的综合评分为因变量,采用加权评分法优选南五味子的酒蒸工艺^[9]。由于各成分的药效贡献值大小未知,故设定权重系数均为 1/3,试验安排及结果见表 2。

表 1 酒蒸南五味子炮制工艺 Box-Behnken 试验因素水平

编码水平	A 加酒量 /g	B 闷润时间 /h	C 蒸制时间 /h
-1	5.0	1	3.0
0	12.5	2	5.5
1	20.0	3	8.0

表 2 酒蒸南五味子炮制工艺 Box-Behnken 试验安排

No.	A	B	C	总皂苷 /%	总木脂素 /%	总多糖 /%	综合 评分
1	-1	0	1	4.649	12.197	6.426	95.41
2	0	0	0	4.159	11.363	4.813	82.40
3	1	0	1	4.525	11.437	5.760	73.46
4	0	0	0	3.705	10.605	3.748	84.31
5	1	0	-1	3.773	9.746	5.864	79.92
6	-1	-1	0	4.140	9.707	8.688	95.08
7	-1	0	-1	4.624	9.340	5.801	84.62
8	0	1	1	3.448	6.575	3.061	66.38
9	0	-1	1	4.428	10.056	5.268	82.79
10	0	-1	-1	4.738	9.942	5.795	87.06
11	1	-1	0	4.146	9.429	6.531	74.71
12	-1	1	0	3.465	7.934	4.862	83.27
13	0	0	0	3.925	8.663	6.931	82.82
14	0	0	0	4.272	7.889	5.327	83.02
15	0	1	-1	4.213	9.531	6.137	83.70
16	1	1	0	4.128	10.390	6.692	71.92
17	0	0	0	4.567	9.721	7.452	80.64

运用 Design Expert 8.05 软件对各组综合评分数据进行多元回归和二项式分析,得南五味子酒蒸工艺的综合评分(Y)与 3 个自变量的二次回归模型方程 $Y = 82.64 - 7.30A - 4.29B - 2.16C + 2.26AB - 4.31AC - 3.26BC + 0.99A^2 - 2.38B^2 - 0.27C^2$ ($R^2 = 0.9424$),对该回归模型进行方差分

析,见表 3。结果显示模型 $F = 6.176$ ($P = 0.0127 < 0.05$),表明该模型可用来预测炮制工艺参数,一次项 A, B 对综合评分影响极显著或显著,其他项则均无显著性影响,说明各考察因素对响应值的影响不是简单的线性关系。综合评分与各自变量响应面分析的等高线见图 1~3。

表 3 综合评分回归模型方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
模型	775.438	9	86.160	6.176	0.0127
A	425.750	1	425.750	30.518	0.0009
B	147.565	1	147.565	10.577	0.0140
C	37.260	1	37.260	2.671	0.1462
AB	20.348	1	20.348	1.459	0.2664
AC	74.353	1	74.353	5.330	0.0543
BC	42.581	1	42.581	3.052	0.1241
A ²	4.124	1	4.124	0.296	0.6035
B ²	23.908	1	23.908	1.714	0.2318
C ²	0.315	1	0.315	0.023	0.8849
残差	97.656	7	13.951		
纯误差	7.012	4	1.753		
总差	873.095	16			

根据回归方程预测南五味子酒蒸的最佳炮制工艺参数为每 100 g 原药材加酒量 10.95 g,闷润时间 1.05 h,蒸制时间 6.45 h。但为便于工业化操作,将炮制的工艺参数修正为每 100 g 药材加酒量 11 g,闷润时间 1 h,蒸制时间 6.5 h。取南五味子药材 100 g,共 3 份,按该工艺参数平行进行 3 次验证试验,结果皂苷类、木脂素类及多糖类成分的质量分数平均值分别为 6.386%,12.297%,4.659%,RSD 分别为 2.31%,3.212%,1.46%,综合评分 95.58,与理论预测值(96.28)偏差 0.72%,说明优选的工艺条件稳定可行。

3 讨论

南五味子酒蒸工艺考察常仅以总木脂素含量为评价标准^[2],本文以皂苷类、木脂素类、多糖类成分的综合评分为评价指标,从多化学部位的角度对南五味子酒蒸工艺进行筛选,避免了选取单一化学部位或化学成分作为评价指标的片面性,为酒制南五味子炮制饮片的生产和临床应用提供参考。目前关

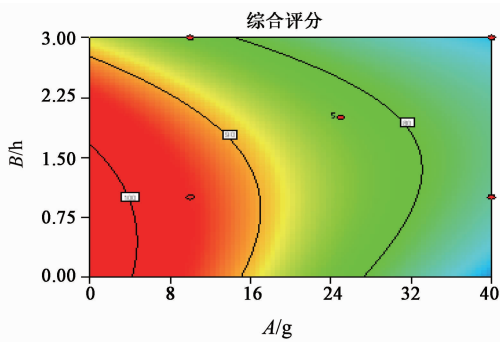


图 1 闷润时间和加酒量对酒蒸南五味子炮制工艺影响的等高线

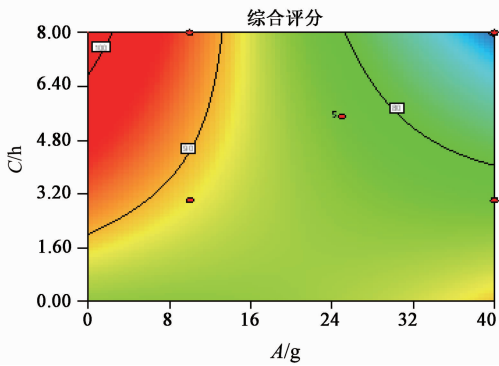


图 2 蒸制时间和加酒量对酒蒸南五味子炮制工艺影响的等高线

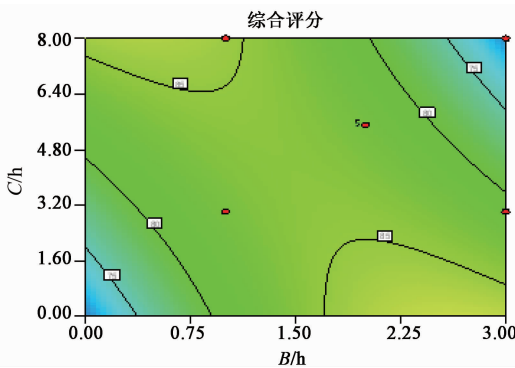


图 3 酒制时间和闷润时间对酒蒸南五味子炮制工艺影响的等高线

于南五味子酒蒸工艺的优选主要采用正交试验^[2], 该方法不能在给出的整个区域上找到考察因素和响应值间的函数表达式, 从而无法找到因素的最佳组合和响应值的最优值^[7]; 而响应面法是通过一系列确定性的试验拟合一个响应面来模拟真实极限状态曲面, 研究因子与响应值间、因子与因子间的相互关系^[10], 采取较少的试验次数优选南五味子酒蒸工艺参数。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 298.
- [2] 何颖, 邹爱英. 影响南五味子质量的主要因素探讨[J]. 天津药学, 2013, 25(3): 40.
- [3] 孙毅, 张晓利, 程慎令. 五味子的炮制与应用研究[J]. 中国民族民间医药, 2010, 19(20): 25.
- [4] 葛会奇. 五味子炮制工艺规范化及原理研究[D]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2007.
- [5] 邓翀, 颜永刚, 梁婷, 等. 多指标综合评价南五味子木脂素提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(9): 4.
- [6] 陈英文, 黄明宏. 金樱叶总皂苷的提取纯化工艺研究[J]. 光明中医, 2011, 26(2): 229.
- [7] 宋小妹, 考玉萍. 不同产区南五味子中木脂素含量测定[J]. 陕西中医, 2004, 25(7): 6451.
- [8] 徐鹏, 胡素, 李云耀, 等. 不同产地金樱子中多糖和总黄酮的含量测定[J]. 中国药师, 2012, 15(5): 648.
- [9] 王冰, 宋崎, 周小初, 等. 综合加权评分法优化山萸肉蒸制工艺[J]. 中成药, 2008, 30(10): 1686.
- [10] 邓翀, 郑洁, 宋小妹. 指纹图谱结合响应面法研究醋制南五味子炮制工艺[J]. 中成药, 2012, 34(8): 1563.

[责任编辑 刘德文]