

引用: 万丹, 沈冰冰, 陈林, 谢景, 丁志平, 张水寒. Box - Behnken 设计 - 效应面法优选百合防褐变加工工艺研究[J]. 湖南中医杂志, 2020, 36(8): 167 - 170.

Box - Behnken 设计 - 效应面法优选百合防褐变加工工艺研究

万丹¹, 沈冰冰¹, 陈林¹, 谢景¹, 丁志平², 张水寒¹

(1. 湖南省中医药研究院, 湖南 长沙, 410006;

2. 湖南春光九汇现代中药有限公司, 湖南 长沙, 410331)

[摘要] 目的: 优选百合防褐变的加工工艺。方法: 在单因素试验基础上, 以王百合苷 B 含量、褐变度、浸出物为评价指标, 采用 Box - Behnken 设计效应面法考察烫片时间、干燥温度、干燥时间对其质量的影响, 优选百合的防褐变加工工艺参数。结果: 百合防褐变加工工艺为烫片时间 3.5 min, 干燥温度 90℃, 干燥时间 3.0 h。结论: 优选的百合防褐变加工工艺合理可行, 可适用于工业生产。

[关键词] 百合; 王百合苷 B; 防褐变; Box - Behnken 设计; 实验研究

[中图分类号] R282.4 **[文献标识码]** A **DOI:** 10.16808/j.cnki.issn1003-7705.2020.08.063

The study of optimization of anti - browning processing for lily based on the Box - Behnken design - response surface method

WAN Dan¹, SHEN Bingbing¹, CHEN Lin¹, XIE Jing¹, DING Zhiping², ZHANG Shuihan¹

(1. Hunan Academy of Chinese Medicine, Changsha 410006, Hunan, China;

2. Hunan Chunguang Jiuhui Modern Chinese Traditional Medicine Co., Ltd., Changsha 410331, Hunan, China)

[Abstract] Objective: To optimize the anti - browning processing technique for lily. Methods: Based on the single - factor experiment and with the content of regaloside B, browning degree, and extract as assessment indices, the Box - Behnken design - response surface method was used to evaluate the influence of heating time, drying temperature, and drying time on quality and then determine the optimized anti - browning processing parameters for lily. Results: The anti - browning processing parameters for lily were a heating time of 3.5 minutes, a drying temperature of 90℃, and a drying time of 3.0 hours. Conclusion: The optimized anti - browning processing parameters for lily are reasonable and feasible and can thus be used in industrial production.

[Keywords] lily; regaloside B; anti - browning; Box - Behnken design; experimental study

百合为百合科植物卷丹 *Lilium lancifolium* Thunb.、百合 *Lilium brownii* F. E. Brown var. *viridulum* Baker 或细叶百合 *Lilium pumilum* DC. 的干燥肉质鳞叶, 始载于《神农本草经》, 为“养肺阴, 补肺气”之要药, 也是最具代表性的药食两用药材之一。湖南邵阳地区所产百合, 片形狭长, 两端渐尖、色白肉厚, 冠以“龙牙百合”之名, 是被历代认为品质最佳的百合道地药材。有研究报道, 鲜百合采收后发生的褐变反应是影响百合药材品质形成的关键^[1-4]。本实验拟通过 Box - Behnken 响应面对百合防褐变加工工艺条件进行优选, 为百合的产地初加工研究及其质量评价提供参考。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 岛津 LC - 20AT 高效液相色谱仪系统, AL204 型电子分析天平 (METTLER TOLEDO), KQ5200DE 型超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司), CR - 400 型色差计 (柯尼卡美能达公司), Labonce - 9240A 电热鼓风干燥箱 (北京兰贝石恒温技术有限公司)。

1.2 试剂 乙腈为色谱纯 (美国 TEDIA 公司), 水为怡宝纯净水, 其他试剂均为分析纯。对照品王百合苷 B (批号: P28S10F99182) 购自上海源叶生物科技有限公司, HPLC ≥ 98%。百合于 2019 年 8 月采自湖南邵阳, 经湖南省中医药

基金项目: 国家中药标准化项目 (ZYBZH - Y - HUN - 21) 中央本级重大增减支项目子课题 (2060302 - 1607 - 01); 中央支持地方项目 (2019XF5062); 中药材质量保障项目

第一作者: 万丹, 女, 助理研究员, 研究方向: 中药资源及制剂研究

通讯作者: 张水寒, 女, 教授, 博士研究生导师, 研究方向: 中药资源、制剂及质量标准研究, E - mail: Zhangshuihan0220@126.com

研究院中药研究所助理研究员鉴定为百合科植物百合 *Lilium brownii* F. E. Brown var. *viridulum* Baker 的肉质鳞叶。

2 方法与结果

2.1 王百合苷 B 含量测定 参考文献[5-6]进行。

2.1.1 色谱条件与系统适用性试验 色谱柱: Agilent Eclipse Plus C₁₈ (4.6 × 250 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈(A) - 0.3% 甲酸水(B) 梯度洗脱: 0 ~ 2 min, 5% ~ 13% 乙腈; 2 ~ 17 min, 13% ~ 15% 乙腈; 17 ~ 37 min, 15% ~ 20% 乙腈; 37 ~ 42 min, 20% ~ 100% 乙腈; 柱温: 30 °C; 检测波长: 250 nm; 流速: 1 mL/min; 进样体积 10 μl。

2.1.2 对照品溶液的制备 取对照品适量, 精密称定, 加 80% 甲醇制成每 1 ml 含王百合苷 B 1046 μg 的对照品溶液, 即得。

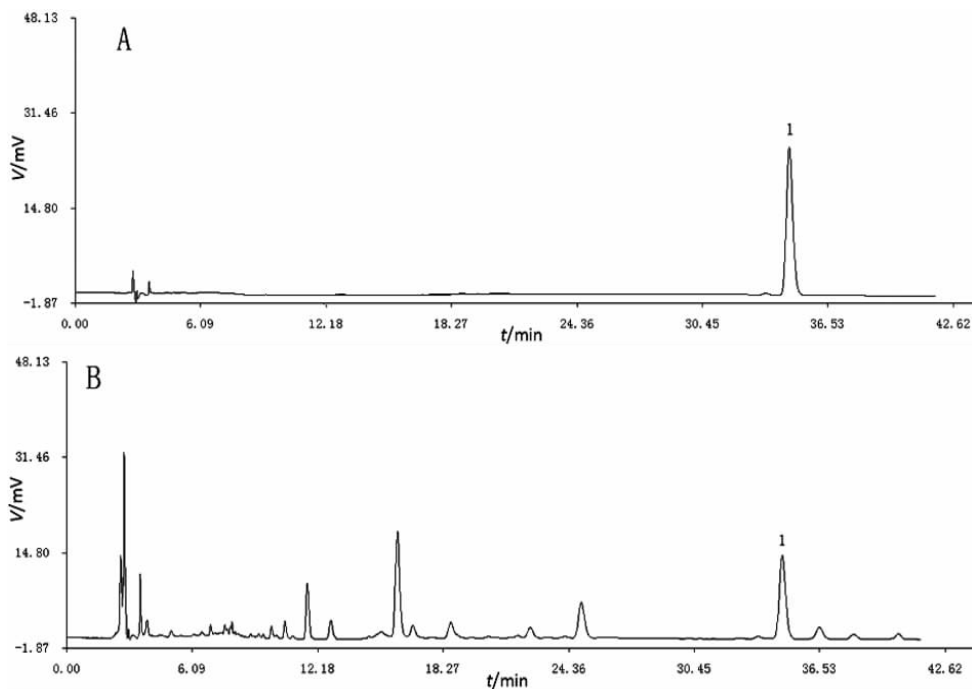
2.1.3 供试品溶液的制备 取样品粉末约 1 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 80% 甲醇 10 ml, 称定重量, 超声

处理(功率 500w, 40 KHz) 30 min, 放冷, 再称定重量, 用 80% 甲醇补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.1.4 样品测定 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, 测定结果见图 1。

2.1.5 线性关系考察 将对照品溶液稀释成 7 个浓度, 取各个浓度的对照品溶液各 10 μl 注入高效液相色谱仪, 按上述色谱条件测定峰面积。以峰面积为纵坐标(Y)、对照品质量浓度(μg/ml)为横坐标(X), 绘制标准曲线, 得到回归方程和相关系数。Y = 1656.7X + 4487.9, r = 0.9993, 线性范围 10.46 ~ 575.3 μg/ml。

2.1.6 精密度试验 取同一批次百合供试品溶液注入液相色谱仪, 按照上述色谱条件, 连续进样 6 次, 测定峰面积。结果王百合苷 B 峰面积的 RSD 为 0.35%, 表明仪器精密度良好。



注: A—对照品; B—百合饮片; 1—王百合苷 B

图 1 百合 HPLC 图谱

2.1.7 重复性试验 取同一批次百合样品共 6 份, 按“2.1.3”项下方法制备, 制备供试品溶液, 按照上述色谱条件, 分别进样, 测定峰面积。结果王百合苷 B 峰面积的 RSD 为 2.06%, 表明该分析方法重现性良好。

2.1.8 稳定性试验 取同一批次百合供试品溶液, 按照上述色谱条件, 分别在 0、2、4、6、8、12 h 进样, 测定峰面积。结果王百合苷 B 峰面积的 RSD 为 0.24%, 表明供试品溶液在 12 h 内稳定性良好。

2.1.9 加样回收试验 取已知含量的百合样品 6 份 0.5 g, 精密称定, 分别加入一定量的对照品, 按“2.1.3”项下方法制备, 进样测定, 结果王百合苷 B 的平均加样回收率为

97.23%, RSD 为 2.14%。表明该方法准确可行。

2.2 褐变度测定 采用 CR-400 型色差计测定。用标准陶瓷板作为工作标准, 测量样品表面再测样盒中的反射光。本实验主要以 L 值大小作为百合褐变程度的指标, L 值越大, 表示颜色越白, 褐变程度越轻^[7]。

2.3 浸出物测定 按照《中国药典》^[8] 四部通则 2201 热浸法测定水溶性浸出物含量。

2.4 百合防褐变加工工艺单因素实验 在百合饮片的加工过程中, 烫片时间(A)、干燥温度(B)、干燥时间(C)对饮片质量影响较大, 因此本研究对上述因素进行考察, 根据实验结果确定 Box - Behnken 响应面实验的因素水平。

2.4.1 烫片时间考察 在预实验中,发现烫片时间低于 30s 时,饮片在 1 h 内颜色易变淡棕色。因此,设计 5 组实验,每组各 200 g,考察在沸水中热烫(30s、1 min、3 min、5 min、7 min)后,过冷水,90℃干燥 3 h,测定样品的王百合苷 B 含量、褐变度、浸出物的综合评分。结果当烫片 3 min 后,综合评分呈下降趋势,故选择 1、3、5 min 作为响应面的 3 个水平。

2.4.2 干燥温度考察 取净百合药材 5 份,每份各 200 g,在沸水中热烫 3 min 后,过冷水,分别在干燥温度(60℃、70℃、80℃、90℃、100℃)下干燥 3 h,测定综合评分。结果在干燥温度为 90℃时,其评分最高,故选择 80℃、90℃、100℃作为响应面的 3 个水平。

2.4.3 干燥时间 取净百合药材 5 份,每份 200 g,在沸水中热烫 3 min 后,过冷水,在干燥温度为 90℃下干燥(1、2、3、4、5 h),测定综合评分。结果在干燥时间为 3 h 时,其评分最高,故选择 2、3、4 h 作为响应面的 3 个水平。

2.5 Box – Behnken 响应面优化百合防褐变加工工艺

2.5.1 Box – Behnken 响应面设计 采用 Box – Behnken 实验设计原理,在预实验基础上,选择烫片时间(A)、干燥温度(B)、干燥时间(C)三因素为自变量,以王百合苷 B 含量(W₁)、褐变度(W₂)、浸出物(W₃)指标为效应值,综合评分 = (0.4W₁/W_{max} + 0.4W₂/W_{max} + 0.2W₃/W_{max}) × 100。采用 3 因素 3 水平的效应面分析方法进行分析,设计 17 个试验点的试验方案,设计因素及水平见表 1。具体干燥方法参照文献[7]:取百合药材适量,洗净,过沸水烫片;过冷水,沥干备用,按表 1 效应面设计方案进行实验。分析结果见表 1。

表 1 Box – Behnken 设计及结果

序号	A(min)	B(℃)	C(h)	王百合苷 B W ₁	褐变度 W ₂	浸出物 W ₃	综合 评分
1	5(1)	100(1)	3(0)	0.21	0.95	20.21	82.61
2	3(0)	80(-1)	4(1)	0.22	1.05	21.86	89.05
3	5(1)	80(-1)	3(0)	0.20	1.03	23.20	86.35
4	5(1)	90(0)	4(1)	0.23	0.91	21.02	84.91
5	1(-1)	100(1)	3(0)	0.22	0.96	22.58	86.42
6	3(0)	100(1)	4(1)	0.22	0.96	24.69	88.13
7	3(0)	90(0)	3(0)	0.21	1.12	22.64	90.65
8	1(-1)	90(0)	4(1)	0.21	0.88	18.54	78.75
9	3(0)	100(1)	2(-1)	0.18	1.12	22.58	85.98
10	3(0)	90(0)	3(0)	0.23	1.06	23.20	92.03
11	3(0)	90(0)	3(0)	0.26	0.97	24.68	94.63
12	5(1)	90(0)	2(-1)	0.23	0.88	18.48	81.78
13	3(0)	90(0)	3(0)	0.25	1.08	22.46	95.23
14	1(-1)	90(0)	2(-1)	0.18	0.87	19.17	74.29
15	1(-1)	80(-1)	3(0)	0.19	0.85	19.89	75.70
16	3(0)	90(0)	3(0)	0.26	1.02	18.71	91.58
17	3(0)	80(-1)	2(-1)	0.22	1.10	18.87	88.42

2.5.2 多元二次效应面回归模型的建立与分析 采用 Design – Expert. 8.0.6 软件对表 1 实验数据进行方差分析及二次多项式回归拟合,建立多元二次效应面回归模型,得拟合方程 $Y = 92.82 + 2.56A + 0.45B + 1.30C - 3.62AB - 0.33AC + 0.38BC - 9.01A^2 - 1.05B^2 - 3.88C^2$ (r=0.9360)。(见表 2)

表 2 方差分析

来源	SS	f	MS	F	P
模型	555.85	9	61.76	11.37	0.0021
A	52.48	1	52.48	9.67	0.0171
B	1.64	1	1.64	0.30	0.5999
C	13.44	1	13.44	2.48	0.1596
A × B	52.27	1	52.27	9.63	0.0173
A × C	0.44	1	0.44	0.081	0.7836
B × C	0.58	1	0.58	0.11	0.7538
A ²	341.68	1	341.68	62.93	<0.0001
B ²	4.60	1	4.60	0.85	0.3877
C ²	63.49	1	63.49	11.69	0.0111
残差	38.01	7	5.43		
失拟项	22.05	3	7.35	1.84	0.2797
误差	15.95	4	3.99		
综合	593.85	16			

由方差分析可知,模型的 P 值为 0.0021 < 0.01,说明实验所采用的二次模型具有非常显著的影响,具有统计学意义。失拟项 P 值为 0.2797 > 0.05,无明显失拟因素存在,拟合优度良好,表明所得方程与实际拟合中的非正常误差所占比例较小,能较好地反应真实值;因素 A、A × B、A²、C² 项的 P < 0.05,说明这几项对综合评分均有显著影响。

2.5.3 效应面评估及优化 应用 Design Expert 8.0.6 软件绘制三维响应面图和等高线图(见图 2),按照上述条件结合模拟方程进行优化^[9-12],得到优化后的干燥工艺为烫片时间 3.27 min,干燥温度 90.09℃,干燥时间 3.16 h。考虑到实际操作的方便性,将参数调整为烫片时间 3.5 min,干燥温度 90℃,干燥时间 3.0 h。

三维响应面图和二维等高线图可以直观地反映各因素对响应值的影响,响应曲面倾斜度较高,坡度较陡,说明交互作用越明显。由图 2 可以看出,烫片时间与干燥温度的曲面较陡,说明烫片时间与干燥温度交互作用对百合的综合评分有显著影响。等高线形状越接近椭圆,2 个自变量的交互作用越强;其形状越接近圆形,2 个自变量的交互作用越弱。由 3 个等高线图可以看出,烫片时间与干燥温度、干燥温度和干燥时间的交互作用均大于烫片时间与干燥时间的交互作用。

2.5.4 工艺验证 照上述已确定的最佳干燥工艺条件进行 3 次验证试验,测得综合评分平均值为 91.28, RSD 为 1.21%,接近预测值,说明确定的百合加工工艺稳定可行。

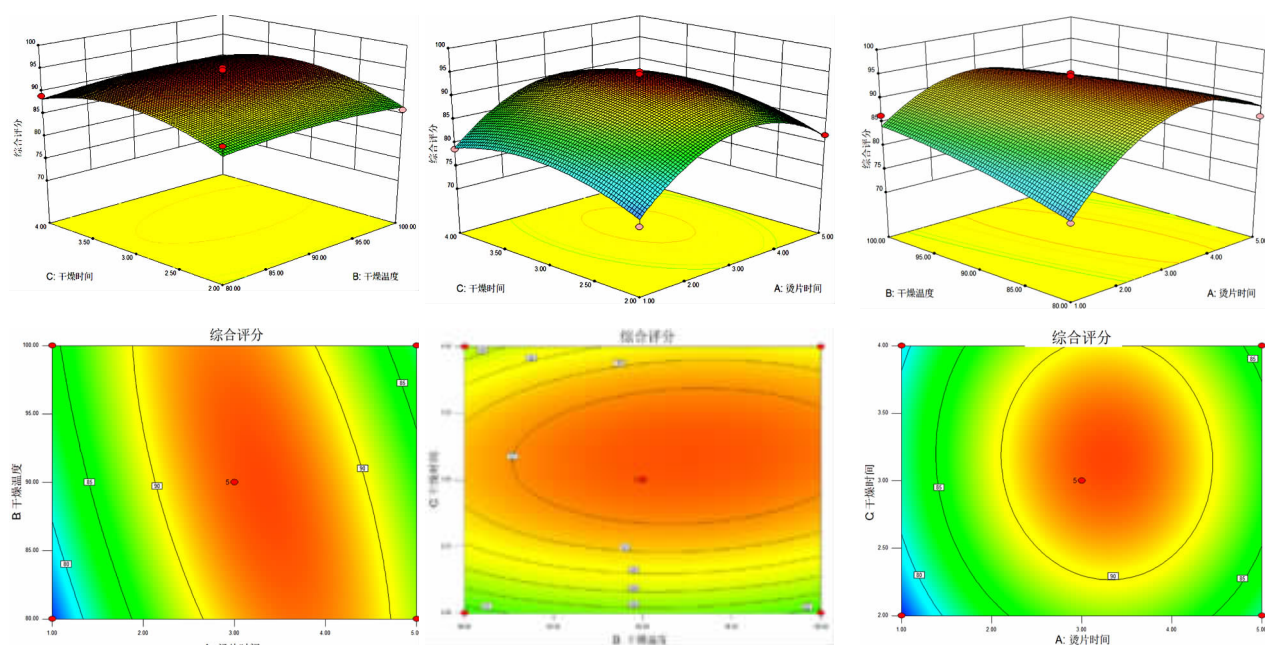


图2 各因素对百合综合评分影响的响应面图和等高线图

3 讨论

百合发生褐变可分为酶性褐变和非酶性褐变。百合中含有丰富的多酚氧化酶、过氧化物酶,极易发生酶性褐变,甚至发黑,所以百合在产地初加工时一般会经沸水热烫钝化相关酶以排除氧气,抑制百合的酶性褐变^[4,13]。非酶褐变是果蔬中比较复杂的反应,影响因素很多,本实验主要考察其干燥条件对非酶褐变的影响。基于此,本试验采用响应面法设计试验,优选加工工艺,与传统的正交设计实验相比,该法能较好地反映各因素及其交互作用与响应值之间的关系。

百合中含有王百合苷 A~E 等多种酚酸甘油酯类物质,具有较好的抗氧化、抗肿瘤、免疫调节作用^[6,14],本课题组前期试验表明,王百合苷 B 对鉴别百合品类具有较高的贡献度^[15],因此本实验选用王百合苷 B 作为含量测定指标成分。褐变值能较好的反应在百合加工过程中褐变情况,可以作为评价百合质量的依据。浸出物含量能反映饮片质量。因此,给与 3 个内在载量指标不同规定权重系数用于评价饮片质量。

综上,本实验选择王百合苷 B、褐变值、浸出物的综合指标作为响应值考察百合防褐变加工工艺。实验结果表明,实验优选工艺条件可行,加工后的饮片质量较好,基本无褐变现象产生,可以为工业化、标准化生产提供可靠的参考依据。

参考文献

- [1] 高凯丽,胡文忠,刘程惠,等. 茶树精油熏蒸处理对轻加工百合褐变及品质的影响[J]. 食品工业科技,2019,40(18):267-272.
- [2] 阚娟,万冰,解王晶,等. 百合鳞片褐变过程中膜脂过氧化研

究[J]. 食品科学,2019,40(1):9-15.

- [3] 万冰. 微加工百合鳞茎褐变机制及其调控研究[D]. 扬州:扬州大学,2018.
- [4] 李瑞琦,马玉翠,吴翠,等. 百合采收后加工包装贮藏环节的调查[J]. 中国实验方剂学杂志,2019,25(23):151-155.
- [5] 聂慧,严辉,钱大玮,等. 加工方法对百合质量的影响研究[J]. 中国现代中药,2013,15(4):308-313.
- [6] 张黄琴,严辉,钱大玮,等. 不同产地百合药材中 8 种活性成分的分析与评价[J]. 中国中药杂志,2017,42(2):311-318.
- [7] 徐菲. 百合的防褐变干燥工艺与质量研究[D]. 长沙:湖南中医药大学,2011.
- [8] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 四部. 北京:中国医药科技出版社,2015:2101.
- [9] 孟冉,张振凌,王胜超,等. BOX - Behnken 响应面法优选麸炒白芍工艺[J]. 中华中医药学刊,2019,37(2):357-360,532.
- [10] 戴衍朋,孙立立,周倩,等. Box - Behnken - RSM 法优化宣木瓜最佳产地加工工艺的研究[J]. 时珍国医国药,2019,30(1):106-108.
- [11] 许天阳,董坤园,宋凤媛,等. Box - Behnken 响应面法优化炒赤芍炮制工艺[J]. 中国药房,2019,20(20):2845-2850.
- [12] 李楠,杨春杰,符新武. 响应面法探讨山楂有机酸最优提取工艺[J]. 运城学院学报,2016,34(6):35-39.
- [13] 聂慧,严辉,钱大玮,等. 加工方法对百合质量的影响研究[J]. 中国现代中药,2013,15(4):308-313.
- [14] 罗林明,裴刚,覃丽,等. 中药百合化学成分及药理作用研究进展[J]. 中药新药与临床药理,2017,28(6):824-837.
- [15] 蔡萍,何丹,陈林,等. 高效液相色谱-飞行时间-串联质谱和随机森林算法的蜜炙百合与生百合指纹图谱研究[J]. 分析科学学报,2019,35(4):474-478.

(收稿日期:2020-03-28)