doi:10.3969 / j.issn.1006 - 4931.2022.17.014

Box - Behnken 响应面法优选莲子超微粉碎制备工艺*

张艳军[1]，刘晓琴[2]

（1. 山西省晋城市中医医院筹建事务中心，山西 晋城 048000；2. 山西中医药大学，山西 晋中 030619）

摘要：目的 优选莲子超微粉的制备工艺。**方法** 以粉碎时间、烘干时间、初始粒度为考察因素，以莲子超微粉累计粒度分布百分数达到50%对应的粒径（D_{50}）为评价指标，采用Box - Behnken响应面法优选最佳制备工艺，并将最佳工艺制得的莲子超微粉进行薄层鉴别及水分、总灰分测定。**结果** 优选的最佳制备工艺为原药材粉碎3 min，过5号筛，60 ℃烘干1 h。优选工艺制备的3批莲子超微粉的平均D_{50}为（710.33 ± 2.87）nm，与预测值706.67 nm接近。所制备的莲子超微粉的水分为5.41%～8.10%，总灰分为2.67%～4.76%，薄层色谱图显色清晰、分离度好、专属性强。**结论** Box - Behnken响应面法优选的莲子超微粉制备工艺合理、可行。

关键词：莲子；超微粉；Box - Behnken响应面法；提取工艺

中图分类号：R932；TQ460.6　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**1006 - 4931（2022）17 - 0054 - 05

Optimization of Superfine Grinding Preparation Process of Nelumbinis Semen Ultrafine Powder by BBD - RSM

ZHANG Yanjun[1], *LIU Xiaoqin*[2]

(1. Jincheng Hospital of Traditional Chinese Medicine Preparation Affairs Center, Jincheng, Shanxi, China 048000; 2. Shanxi University of Chinese Medcine, Jinzhong, Shanxi, China 030619)

Abstract: Objective To optimize the preparation process of Nelumbinis Semen Ultrafine Powder. **Methods** The Box - Behnken design - response surface methodology (BBD - RSM) was used to optimize the preparati process of Nelumbinis Semen Ultrafine Powder with the grinding time, drying time and initial granule size as the investigation factors, and with the granule size at 50% of cumulative granule size distribution (D_{50}) of Nelumbinis Semen Ultrafine Powder as the evaluation index. The Nelumbinis Semen Ultrafine Powder prepared by the optimal process was identified by the thin - layer chromatography (TLC) method, and the contents of moisture and total ash of Nelumbinis Semen Ultrafine Powder were determined. **Results** The optimal preparation process was as follows: the raw materials were ground for 3 min, passed through No. 5 sieve, and dried at 60 ℃ for 1 h. The average D_{50} of the three batches of Nelumbinis Semen Ultrafine Powder prepared by the optimal process was (710.33 ± 2.87)nm, which was close to the predicted D_{50} of 706.67 nm. The moisture content of prepared Nelumbinis Semen Ultrafine Powder was in the range of 5.41% - 8.10%, and the total ash content of prepared Nelumbinis Semen Ultrafine Powder was in the range of 2.67% - 4.76%. The TLC chromatograms showed clear color, good separation and strong specificity. **Conclusion** The preparation process of Nelumbinis Semen Ultrafine Powder optimized by the BBD - RSM is reasonable and feasible.

Key words: Nelumbinis Semen; ultrafine powder; BBD - RSM; extraction process

莲子为睡莲科植物莲*Nelumbo nucifera* Gaertn.的干燥成熟种子，主要含有莲心碱、甲基莲心碱、异莲心碱等生物碱类、黄酮类、糖类成分[1-3]，具有补脾止泻、止带、益肾涩精、养心安神功效[4]，具有抗氧化、抗衰老、抗癌、抗心律失常、降血压、改善心血管功能等作用[5]，广泛用于中医药、保健食品开发、日化用品研发中，市场开发前景巨大[6]。莲子入药通常需粉碎成细粉，而传统粉碎方法制备的莲子细粉药效成分溶出不完全，影响临床疗效。超微粉碎技术是指利用机器或流体动力将0.5～5.0 mm的物料颗粒粉碎至微米甚至纳米级

* **基金项目：**山西省名老中医闫聚禄传承工作室开放基金[2021 - YJL - 003]。

第一作者：张艳军，大学本科，主管中药师，研究方向为临床药学，（电话）0356 - 2065303（电子信箱）154695810@qq.com。

本研究中通过颗粒吸湿性考察和成品转移率考察，最终确定颗粒成型条件为喷雾制粒，底料为糊精 - 甘露醇（3∶1，*m* / *m*）的混合物，底料 - 干膏（2∶1，*m* / *m*），加入0.5%阿斯巴甜作为矫味剂。采用喷雾制粒法制得儿舒平颗粒的吸湿性、流动性、成型性均较好，优选的工艺稳定可行，可用于工业化生产。

参考文献

[1] 辛 国，赵昕彤，黄晓巍. 柴胡化学成分及药理作用研究进展[J]. 吉林中医药，2018，38（10）：1196 - 1198.

[2] 叶先文，夏澜婷，任洪民，等. 白芍炮制的历史沿革及化学成分、药理作用研究进展[J]. 中草药，2020，51（7）：1951 - 1969.

[3] 潘 旭，朱鹤云，张昌浩，等. 龙胆化学成分和药理作用研究进展[J]. 吉林医药学院学报，2020，41（2）：150 - 151.

[4] 裴 瑗，叶 琳，吴作敏，等. 芪桂苓合剂提取工艺研究[J]. 河南中医，2020，40（6）：934 - 937.

[5] 黄庆宝，黄诗莹，陈剑平，等. 正交试验设计法优选六高康颗粒水提工艺[J]. 中国药业，2020，29（7）：74 - 77.

[6] 李 军，姜 华，张延萍，等. 柴胡水煎液中柴胡皂苷a和d的溶出与转化差异[J]. 中国药学杂志，2014，49（19）：1692 - 1696.

[7] 王仁广，杨净尧，张欣舒，等. 柴胡中柴胡皂苷a、柴胡皂苷d的电磁裂解水提取工艺优化[J]. 中国药房，2019，30（18）：2546 - 2551.

（收稿日期：2021 - 09 - 14；修回日期：2022 - 01 - 21）

(5～25 nm)的过程。使用常规粉碎技术所得物料粒径只能达45 μm,而运用超微粉碎技术能使物料粒径达10 μm,甚至1 μm,得到超细粉体。经超微粉碎后,颗粒状物料可在一定程度上提升超微粉的吸附性、溶解性、分散性,有助于营养成分的溶出、机体的消化吸收及物质的充分利用[7];且超微粉碎工艺通常在低温下进行,对于遇高温易分解的有效成分具有一定保护作用[8]。中药经超微粉碎技术处理后,植物细胞壁多数破裂,分布其中的中药活性成分得以暴露,缩短了发挥疗效的时间,提高了生物利用度,减少了用药量,间接节约了中药材资源[9-10]。由于超微粉碎技术应用时间不长,在中药领域的应用中,工艺质量控制是亟需解决的一大难题[11]。同时,由于物料本身的性质及制备过程中受多种因素影响,需对不同类药材的粉碎规律进行深入研究[12]。在单因素试验基础上,响应面法可连续分析试验的各个水平,且试验结果的精度和真实度均高,直观性强[13]。本研究中以莲子超微粉累计粒度分布百分数达到50%对应的粒径(D_{50})为评价指标,考察粉碎时间、烘干时间、初始粉碎粒度对莲子超微粉粒径的影响,采用Box-Behnken响应面法优选莲子超微粉的制备工艺,并将最佳工艺制得的莲子超微粉进行薄层鉴别及水分、总灰分测定。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

DE-200g型万能高速粉碎机(巩义市予华仪器有限责任公司);GZX-9140MBE型电热鼓风干燥箱(上海博讯实业有限公司医疗设备厂);SB-5200DTD型超声波清洗机(宁波新芝生物科技股份有限公司,功率为240 W,频率为40 kHz);AX224ZH/E型电子天平(奥豪斯仪器<常州>有限公司,精度为万分之一);马尔文Zetasizer Nano S90型纳米粒度分析仪(英国马尔文仪器有限公司);SQW-6QI型三清易辰细胞破壁超微粉碎机(济南易辰超微粉碎技术有限公司)。

1.2 试药

丙酮(天津市科密欧化学试剂有限公司,批号为20190120);正己烷(批号为20190108),无水乙醇(批号为20190210),硫酸(批号为20190210),均购自天津市天力化学试剂有限公司;香草醛(天津市光复精细化工研究所);莲子对照药材(中国食品药品检定研究院,批号为YJ-121121);莲子(山西和仁堂中药饮片有限责任公司,批号为180801),经山西省晋城市中医医院筹建事务中心张艳军主管中药师鉴定为正品。

2 方法与结果

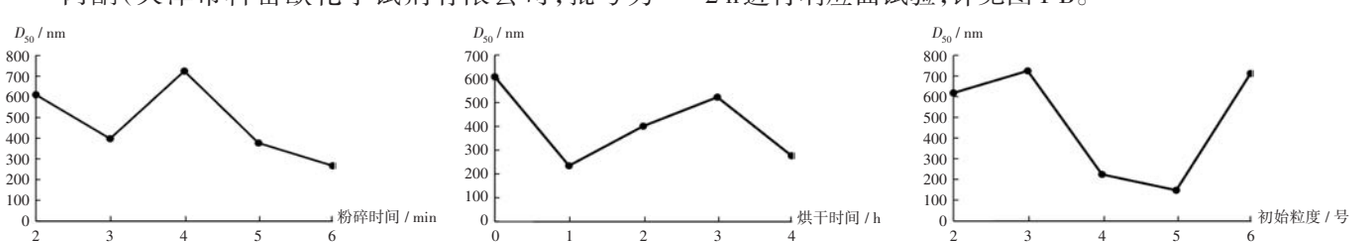
2.1 超微粉碎方法

利用高速粉碎机对莲子进行粗粉碎,分别过2,3,4,5,6号筛后得到莲子粉末,再分别置细胞破壁超微粉碎机中,设置不同粉碎参数进行相应粉碎,备用。

2.2 单因素试验[14-15]

粉碎时间:在过2号筛、烘干0 h的条件下,探讨药材粉碎2,3,4,5,6 min对D_{50}的影响。可见,当粉碎时间为4 min时D_{50}最大,原因可能是随着粉碎时间的增加,粗粉的细胞壁被完全打开,溶出水溶性大分子增多,由此暴露出更多亲水基团,造成粘连,形成团聚体,使粉体的数量减少。故选择粉碎2,3,4 min进行响应面试验,详见图1 A。

烘干时间:以含水量为评价指标进行考察,将莲子粗粉碎粉末过2号筛(24目),分装于烘干至恒重的称量瓶中,于60 ℃温度下分别烘0,1,2,3,4,5,6,7 h,取出,置105 ℃烘箱中烘干至恒重,干燥箱中冷却,测定烘干前后的质量,计算含水量[15]。结果烘干0,1,2,3,4,5,6,7 h的含水量分别为9.92%,5.89%,3.16%,2.79%,2.34%,2.02%,1.75%,1.88%。可见,随着烘干时间的延长,含水量逐渐下降,为确保试验的可研究性和准确性,选取烘干0,1,2,3,4 h进行单因素试验。在粉碎3 min、过2号筛的条件下,探讨药材烘干0,1,2,3,4 h对D_{50}的影响。可见,当烘干1～3 h时D_{50}呈上升趋势,原因可能是随着烘干时间的延长,原料药水分流失逐渐增大,超微粉碎效果越好。当烘干1 h时分子粒径突然减少,随后再度增大,是一个可研究的转折点。故选择烘干0,1,2 h进行响应面试验,详见图1 B。



A. 粉碎时间 B. 烘干时间 C. 初始粒度

图1 单因素试验结果

A. Grinding time B. Drying time C. Initial granule size

Fig. 1 Results of the single-factor test

初始粒度：在粉碎3 min、烘干0 h的条件下，探讨药材过2，3，4，5，6号筛对D_{50}的影响。可见，随着筛号的增加，超微粉的D_{50}呈现先增大后减小再增大的趋势，从过5号筛（80目筛）起D_{50}急剧增大。故选择过4，5，6号筛进行响应面试验，详见图1 C。

2.3 Box－Benhnken响应面试验优化工艺参数

因素与水平：基于单因素试验结果，以粉碎时间（因素A）、烘干时间（因素B）、初始粒度（因素C）为考察因素，以莲子超微粉溶液的D_{50}为响应值，进行三因素三水平响应面试验。因素与水平见表1。

表1 因素与水平

Tab. 1 Factors and their levels

水平	因素A（min）	因素B（h）	因素C（号）
－1	2	0	4
0	3	1	5
1	4	2	6

试验设计与结果：依据Box－Benhnken响应面试验设计原理，采用Design－Expert V 8.0.6软件分析，设计出三因素三水平共17组试验。试验设计与结果见表2。

表2 Box－Benhnken响应面试验设计与结果

Tab. 2 Design and results of the BBD－RSM

序号	因素			D_{50}（nm）	序号	因素			D_{50}（nm）
	A	B	C			A	B	C	
1	－1	1	0	218.52	10	0	0	0	332.01
2	0	0	0	299.04	11	0	0	0	346.00
3	1	0	1	220.17	12	0	－1	－1	257.35
4	0	－1	1	298.51	13	0	1	－1	234.88
5	0	1	1	249.40	14	1	－1	0	284.14
6	0	0	0	278.03	15	0	0	0	356.53
7	1	1	0	408.59	16	1	0	－1	297.46
8	－1	0	1	310.44	17	－1	0	－1	233.78
9	－1	－1	0	254.89					

方差分析：采用Design－Expert V 8.0.6软件对莲子超微粉碎制备工艺的试验数据进行分析，得到响应值D_{50}对烘干时间、粉碎时间、初始粒度的二次多元回归模型方程$Y = 1\,270.387\,50 - 303.625\,00A - 240.450\,00B - 205.400\,00C + 32.225\,00AB - 0.975\,00AC + 0.825\,00BC + 47.437\,50A^2 + 66.987\,5B^2 + 22.437\,5C^2$。方差分析结果见表3，$P < 0.05$为对结果有显著影响，$P < 0.01$为对结果有极显著影响。回归模型$F = 18.070$，$P = 0.000\,5 < 0.01$，表明二次多元回归模型显著；模型决定系数$R^2 = 0.958\,7$，表明该模型对实际值的模拟效果良好，试验误差小；一次项C、交互项AB及二次项A^2，B^2，C^2对超微粉碎的效应均显著。

响应面分析：采用Design－Export 8.0.6软件分析得两因素交互作用对莲子超微粉D_{50}影响的响应面等高线图和三维图（图2）。可见，当$A = 2.88$、$B = 1.07$、$C = 4.62$时莲子超微粉碎效果最佳，预测得莲子超微粉D_{50}为706.67 nm。考虑到实际操作，确定最佳工艺为原药材粉碎3 min，过5号筛，60 ℃烘干1 h。

表3 方差分析结果

Tab. 3 Results of the ANOVA

方差来源	平方和	自由度	均方	F值	P值
模型	4.06×10^4	9	4.51×10^3	18.070	0.000 5
A	5.58×10^2	1	5.58×10^2	2.230	0.178 7
B	2.58×10^2	1	2.58×10^2	1.030	0.343 6
C	2.28×10^3	1	2.28×10^3	9.120	0.019 4
AB	4.15×10^3	1	4.15×10^3	16.630	0.004 7
AC	0.38×10^1	1	0.38×10^1	0.015	0.905 3
BC	0.27×10^1	1	0.27×10^1	0.011	0.919 8
A^2	9.48×10^3	1	9.48×10^3	37.930	0.000 5
B^2	1.89×10^4	1	1.89×10^4	75.640	< 0.000 1
C^2	2.12×10^3	1	2.12×10^3	8.490	0.022 6
残差	1.75×10^3	7	2.50×10^2		
失拟差	1.40×10^3	3	4.67×10^2	5.380	0.068 8
误差项	3.47×10^2	4	8.68×10^1		
总和	4.24×10^4	16			
R^2	0.958 7				

验证试验：按优选工艺制得3批莲子超微粉，测得其D_{50}分别为707，714，710 nm，平均（710.33 ± 2.87）nm，与预测值706.67 nm接近，说明Box－Benhnken响应面法对超微粉碎工艺拟合效果好。

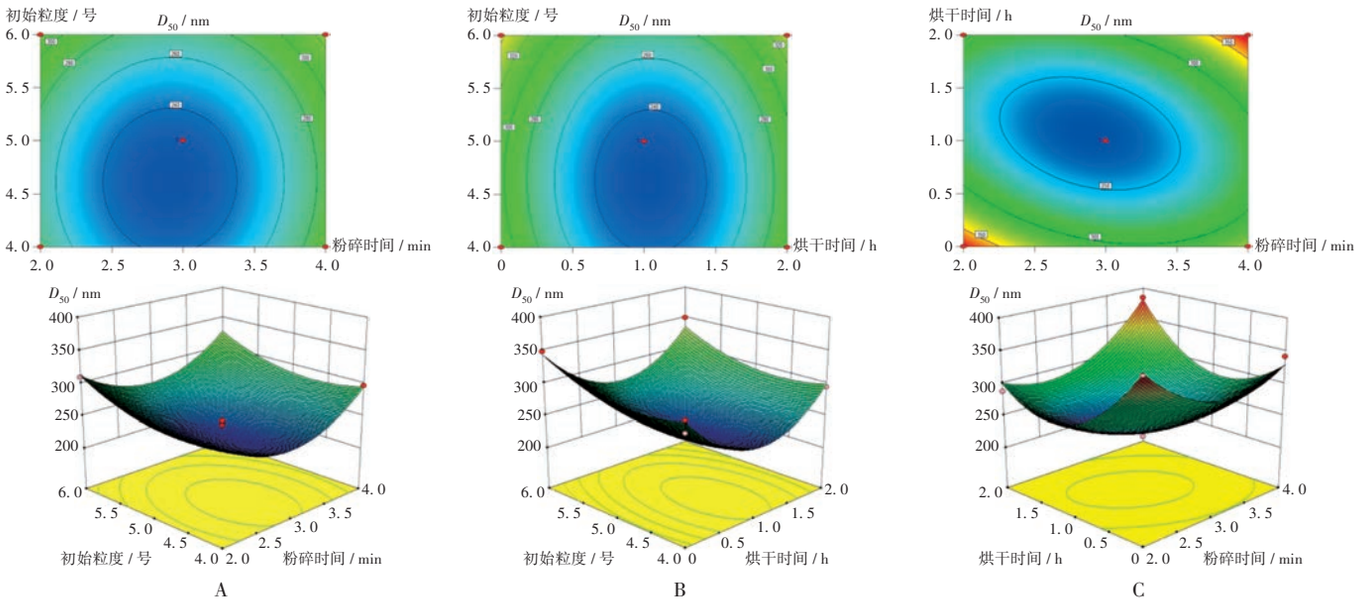
2.4 质量标准研究

薄层色谱鉴别：取莲子对照药材粉末5 g，加三氯甲烷30 mL，摇匀，放置过夜，滤过，滤液蒸干，残渣用2 mL乙酸乙酯使溶解，得对照药材溶液。按优选工艺制备10批莲子超微粉，分别取5 g，按对照药材溶液制备方法制备供试品溶液。吸取对照药材溶液、供试品溶液各2 μL，点于同一硅胶G薄层板上，以正己烷－丙酮（7∶2，V/V）为展开剂，展开，取出，晾干，喷以5%香草醛－10%硫酸乙醇溶液，105 ℃加热至斑点显色清晰，于365 nm波长紫外光灯下观察。供试品溶液与对照药材溶液的色谱图相应位置上显相同颜色的荧光斑点。色谱图见图3。

水分、总灰分测定：取薄层色谱鉴别项下10批（编号为1～10）莲子超微粉，依据2020年版《中国药典（四部）》通则0832水分测定法和通则2302灰分测定法测定水分和总灰分。结果莲子超微粉中水分为5.41%～8.10%，平均6.55%；总灰分为2.67%～4.76%，平均4.07%。详见表4。

3 讨论

中药超微粉技术是在中医药理论基础上，结合中

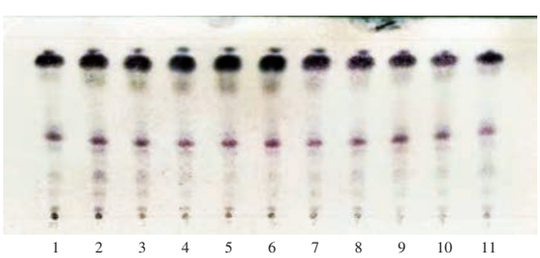


A. 粉碎时间 – 初始粒度　B. 烘干时间 – 初始粒度　C. 粉碎时间 – 烘干时间

图 2　两因素交互作用对莲子超微粉 D_{50} 影响的响应面等高线图和三维图

A. Grinding time – initial granule size　B. Drying time – initial granule size　C. Grinding time – drying time

Fig. 2　Contour diagrams and three – dimensional diagrams of response surface of the effects of two – factor interaction on the D_{50} of Nelumbinis Semen Ultrafine Powder



1. 对照药材溶液　2 – 11. 供试品溶液

图 3　莲子超微粉薄层色谱图

1. Reference medicinal materials solution　2 – 11. Test solution

Fig. 3　TLC chromatograms of Nelumbinis Semen Ultrafine Powder

表 4　莲子超微粉水分和总灰分测定结果(%)

Tab. 4　Results of content determination of moisture and total ash of Nelumbinis Semen Ultrafine Powder (%)

编号	水分	总灰分	编号	水分	总灰分
1	6. 25	4. 23	6	6. 48	4. 00
2	7. 24	4. 32	7	6. 63	3. 81
3	6. 47	4. 08	8	6. 26	4. 10
4	6. 46	2. 67	9	6. 23	4. 55
5	8. 10	4. 15	10	5. 41	4. 76

药材自身特点，将饮片进行超微粉化的新型技术。药材经超微粉化处理后，能提高其有效成分的溶出率和生物利用度，增强药效[9,12,16–20]。莲子为药食两用药材，具有降压、抗心律失常、抗氧化、神经保护、抗炎等作用，临床广泛用于治疗糖尿病、阿尔茨海默病[21]、非小细胞肺癌[22]、高血压[23]等。中药超微粉碎技术的应用，使莲子在发挥药效作用的基础上，实现了携带便利、服用方便、生物利用度好的优点，对于提升莲子产业价值、开发莲子新食品、拓宽深加工途径具有重要意义，同时可促进莲子精深加工产业及中药超微粉产业的健康、可持续发展，提升中医药的世界认可度。

本研究中采用 Box – Behnken 响应面法优化的莲子超微粉碎最佳工艺为，原药材粉碎 3 min，过 5 号筛，60 ℃烘干 1 h。按最优工艺条件制备的莲子超微粉的平均 D_{50} 为(710. 33 ± 2. 87)nm，且薄层色谱显色清晰，分离度好，专属性强，为制订莲子相应的质量标准提供了参考。

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，2020：285.

[2] 齐欢欢，祖明艳，杨平仿. 莲子食用价值研究进展[J]. 植物科学学报，2020，38(5)：716 – 722.

[3] 王协和，顾　超，周雁玲，等. 基于指纹图谱及一测多评法的莲子心质量评价研究[J]. 中药材，2020，43(10)：2493 – 2498.

[4] 李　婧，刘玉翠，闫　莉，等. 基于响应面法与色度学的炒莲子工艺与质量标准研究[J]. 时珍国医国药，2020，31(11)：2641 – 2645.

[5] AROOJ M，IMRAN S，INAM – UR – RAHEEM M，et al. Lotus seeds (*Nelumbinis semen*) as an emerging therapeutic seed：A comprehensive review[J]. Food Sci Nutr，2021，9(7)：3971 – 3987.

[6] 张超文，谢梦洲，王亚敏，等. 药食同源莲子的应用研究进展[J]. 农产品加工，2019(3)：80 – 82.

[7] 胡　杨，黄解珠，周晓英，等. 参苓白术散超微粉碎技术在育肥猪中的应用效果[J]. 江西畜牧兽医杂志，2018(6)：22 – 24.

[8] 杨春瑜，柳双双，梁佳钰，等. 超微粉碎对食品理化性质影