

星点设计-效应面法优选米泔水漂白术炮制工艺

黄小方^{1,2}, 鄢庆祥^{2,3}, 龚鹏飞¹, 于欢¹, 钟凌云¹, 龚千锋¹

1. 江西中医药大学药学院, 江西 南昌 330006

2. 江西中医药大学科技学院, 江西 南昌 330006

3. 广西中医药大学药学院, 广西 南宁 530200

摘要: 目的 优选樟帮特色米泔水漂白术炮制工艺, 为米泔水漂白术炮制规范提供科学依据。方法 采用星点设计-效应面法进行米泔水漂白术炮制工艺设计, 以米泔水用量、漂洗时间、漂洗温度为考察因素; 采用 HPLC 法测定白术内酯 I、II、III 等成分量, 进行加权综合评分计算 OD 值(归一化值), 采用 Design Expert 进行 2 次项回归拟合, 优选其最佳工艺并进行验证。结果 最佳炮制工艺漂洗条件为米泔水用量为 9 倍、漂洗时间 55 h、漂洗温度 26 ℃, 在此条件下, 白术内酯 I、II、III 等成分量综合评分 OD 值为 0.960。结论 米泔水漂白术在此条件下稳定可行, 能为米泔水漂白术饮片生产与质量标准规范提供参考。

关键词: 樟帮; 白术; 米泔水; 漂制; 炮制工艺; 星点设计-效应面法; 白术内酯 I; 白术内酯 II; 白术内酯 III

中图分类号: R283.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)01-0109-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.01.015

Optimization of rice-washed water rinsing process technology for *Atractylodis Macrocephalae Rhizoma* by central composite design-response surface methodology

HUANG Xiao-fang^{1, 2}, YAN Qing-xiang^{2, 3}, GONG Peng-fei¹, YU Huan¹, ZHONG Ling-yun¹, GONG Qian-feng¹

1. School of Pharmacology, Jiangxi University of TCM, Nanchang 330004, China

2. College of Science and Technology, Jiangxi University of TCM, Nanchang 330004, China

3. School of Pharmacology, Guangxi University of TCM, Nanning 530200, China

Abstract: Objective To optimize the processing technology of *Atractylodis Macrocephalae Rhizoma* prepared by rice-washed water rinsing, and provide a scientific basis for producing specification in processing. **Methods** Design the processing with central composite design-response surface methodology and take the factors of volume of rice-washed water, rinsing time, and rinsing temperature as independent variables. The contents of atractylenolide I, II, and III were determined by HPLC and the comprehensive scores of the three components were regarded as the response index or OD. By analyzing with Design Expert, the best processing parasite for the experiment could be induced. **Results** The best processing conditions were 9-time volume of rice-washed water, 55 h for rinsing, and at the temperature of 26 ℃. On the selected condition, the value of OD was at 0.960. **Conclusion** The rice-washed water rinsing processing technology for *Atractylodis Macrocephalae Rhizoma* is stable and feasible under the condition selected, which can be used as reference for its production and quality control.

Key words: “Zhangbang”; *Atractylodis Macrocephalae Rhizoma*; rice-washed water; rinsing; processing technology; central composite design-response surface methodology; atractylenolide I; atractylenolide II; atractylenolide III

药材白术 *Atractylodis Macrocephalae Rhizoma* Koidz. 的干燥根茎, 主产于浙江、安徽、江西、湖南、湖北、河北、陕西等地。其性苦、甘, 温, 归

收稿日期: 2016-09-19

基金项目: 国家自然科学基金资助(81460604); 江西省卫生厅中医药科研课题(2014Z002)

作者简介: 黄小方, 博士研究生在读, 讲师, 主管中药师, 研究方向为中药品种质量鉴定与临床应用。

Tel: (0791)86563105 E-mail: koshoho@126.com

*通信作者 龚千锋, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药炮制及其机制研究。Tel: (0791)87118852 E-mail: gongqf2006@163.com

脾、胃经；有补气健脾、燥湿利尿、固表止汗、安胎之功效^[1]，白术主要成分为挥发油、内酯类和多糖成分等^[2-4]。除生白术外，常见的炮制规格尚有：焦白术、麸炒白术、土炒白术、米泔水漂白术、蜜糠炒白术等^[5-7]，目前，生白术、焦白术、麸炒白术、土炒白术等研究报道较多，而米泔水漂白术现代研究未见报道。

米泔水漂白术和蜜糠炒白术^[6]均为樟帮特色炮制品种，在江西地区临床应用历史悠久，具有较好疗效。传统炮制理论认为白术为健脾要药，经水泔水制后能减弱其燥性，提高其健脾之力^[8]。现代药理研究表明，白术内酯为白术主要的药效成分^[9-13]。本实验在课题组前期对蜜糠炒白术炮制工艺研究的基础上^[14]，以白术内酯 I、II、III 等成分量为指标，采用星点设计-效应面法^[15]进行米泔水炮制工艺的设计，考察了米泔水用量、漂洗时间、漂洗温度等因素对炮制工艺的影响，优选其炮制工艺，为提高樟帮米泔水漂白术的科学内涵以及今后工业化生产米泔水漂白术提供依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器与设备

HH-6 数显恒温水浴锅，常州国华电器有限公司；FW135 型中草药粉碎机，天津泰斯特仪器有限公司；Ultimate3000 型高效液相全自动色谱仪，美国 Dionex 公司，PDA 二极管阵列紫外检测器，Chromelon 色谱工作站；AE240 型 1/10 万电子天平，瑞士梅特勒-托利多公司。

1.2 材料

生白术片，江西江中中药饮片有限公司，批号 151119，产地江西武宁，经江西中医药大学药学院邓可众副教授鉴定为菊科苍术属植物白术 *Atractylodes macrocephala* Koidz. 的干燥根茎；大米，中粮集团，生产日期 2015-09-08，产地：江西南昌。

1.3 试剂

甲醇、乙腈，色谱纯，西陇化工股份有限公司；纯净水，自制双蒸水；白术内酯 I、II、III，批号分别为 BCTG-0032、BCTG-0033、BCTG-0034，HPLC 峰面积归一法测得质量分数均 >98%，均购自江西本草天工科技有限责任公司。

1.4 分析软件

星点设计-效应面法分析软件 Design Expert DX8.2，State-east 公司。

2 方法与结果

2.1 米泔水的制备

根据预试验、文献资料^[16-17]与工业化实际操作需要，本实验米泔水采用米粉拌水形成混悬液的方式。将大米粉碎，过 64 目筛，临用前以米粉与水 2：100 进行米泔水配比，充分搅拌形成米泔水。

2.2 米泔水漂白术的制备

称取 20.0 g 生白术片，置 250 mL 烧杯中，加一定量的米泔水，置恒温水浴锅中漂洗。每一处理组均平行实验 3 份，样品每 8 h 更换米泔水，至漂洗时间结束。每份样品米泔水漂后，同温度同体积清水再漂洗 4 h，放入烘箱 30 ℃ 烘至恒定质量，供定量测定。

2.3 白术内酯的定量测定

2.3.1 色谱条件 采用岛津 Intersil C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm)；流动相为乙腈-水 (70：30)；体积流量 1.0 mg/mL；柱温 30 ℃；PDA 全波段扫描双波长检测 220 nm (白术内酯 I 和白术内酯 III) 和 276 nm (白术内酯 II)，进样量为 10 μL，色谱图见图 1。

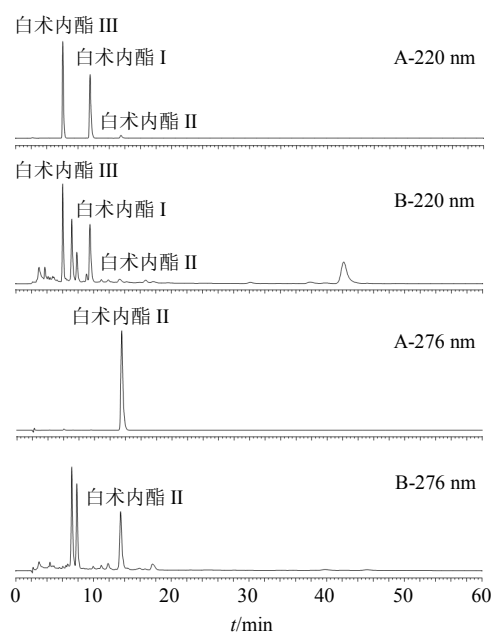


图 1 白术内酯对照品 (A) 与白术炮制品 (B) HPLC 图
Fig. 1 HPLC of atractylenolide reference substance (A) and AMR sample (B)

2.3.2 混合对照品溶液的制备 精密称取白术内酯 I、II、III 对照品适量，分别加甲醇溶解制成对照品储备溶液，分别精密吸取各对照品储备溶液适量，甲醇定容于 10 mL 量瓶中，制成对照品混合液，白

术内酯 I、II、III 质量浓度分别为 0.251、0.151、0.105 mg/mL。

2.3.3 供试品溶液的制备 取米泔水漂白术样品粉末 1.0 g (过 4 号筛), 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 加入 10 mL 甲醇溶液, 称定质量, 35 °C 超声 30 min, 放冷, 再称定, 补足减失的质量, 提取液 3 000 r/min 离心 5 min, 取上清液过 0.22 μm 微孔滤膜, 制样供定量测定。

2.3.4 线性关系考察 精密称取对照品混合液适量, 逐级稀释, 加甲醇定容, 制成 7 份系列质量浓度混合对照品溶液, 按“2.3.1”项色谱条件, 分别连续进样 10 μL。以进样量为横坐标 (X), 以峰面积积分值为纵坐标 (Y), 进行线性回归, 得白术内酯 I、II、III 的回归方程、相关系数和线性范围分别为白术内酯 I $Y=77.145 X-1.054$, $R^2=0.999 9$, 线性范围 0.176~2.510 μg; 白术内酯 II $Y=98.546 X-0.324$, $R^2=0.999 9$, 线性范围 0.075~1.510 μg; 白术内酯 III $Y=48.822 X-0.762$, $R^2=0.999 9$, 线性范围 0.053~1.050 μg。

2.3.5 精密度试验 精密吸取“2.3.2”项下对照品混合液 10 μL, 按“2.3.1”项色谱条件下连续进样 6 次, 计算得白术内酯 I、II、III 的 RSD 值分别 0.62%、0.97%、0.34%, 表明在此色谱条件下本仪器精密度较好。

2.3.6 重复性试验 称取同一米泔水白术炮制品 (表 1 中 15 号样品) 6 份, 分别按“2.3.3”项方法制备供试品溶液, 并按“2.3.1”项下色谱条件进样, 测得白术内酯 I、II、III 的峰面积, 计算质量分数分别为 0.898、0.542、0.562 mg/g, RSD 值分别 2.02%、1.97%、1.34%, 表明在该条件下, 本实验重复性较好。

2.3.7 稳定性试验 取同一米泔水白术炮制品 (表 1 中 15 号样品) 供试品溶液, 按“2.3.1”项下色谱条件分别在 0、6、12、18、24、48 h 进样 10 μL, 计算得白术内酯 I、II、III 峰面积的 RSD 值分别 0.95%、0.53%、1.54%, 表明在该条件下, 白术炮制品供试品溶液在 48 h 稳定。

2.3.8 加样回收率试验 精密称取已测定的样品 (表 3 中 3 号样品, 含白术内酯 I、II、III 分别为 884.3、482.4、583.3 μg/g) 6 份各 0.50 g, 同时取“2.3.2”项下对照品储备液按《中国药典》2015 年版标准添加一定量白术内酯 I、II、III, 进行回收率试验, 样品按“2.3.3”项方法制备, 按“2.3.1”项下色谱条

件测定其量, 计算加样回收率。结果白术内酯 I、II、III 的平均加样回收率分别为 99.73%、100.86%、97.52%, RSD 分别为 1.43%、1.08%、1.26%。

2.4 炮制工艺的优化

2.4.1 星点设计方案与测定结果 本实验以白术内酯 III 量 (Y_1)、白术内酯 I 量 (Y_2)、白术内酯 II 量 (Y_3) 为因变量, 米泔水用量 (A , 倍数)、漂洗温度 (B)、漂洗时间 (C) 为自变量, 采用星点设计-效应面法优选米泔水漂白术的炮制工艺, 星点设计因素水平表见表 1, 采用 Design Expert DX8.2 软件根据此因素水平形成设计方案及定量测定结果, 见表 1。

2.4.2 模型拟合与响应面分析 通过实验测得白术内酯 III 量 (Y_1)、白术内酯 I 量 (Y_2)、白术内酯 II 量 (Y_3), 参考文献白术内酯提取工艺方法进行加权综合评分 (OD), 计算 OD 值^[18-19], OD 值=0.4 $Y_1/Y_{1max}+0.4 Y_3/Y_{3max}+0.2 Y_2/Y_{2max}$, 其中 Y_{1max} 、 Y_{2max} 、 Y_{3max} 为相应成分量的最大值。

以综合评分 OD 值为响应值, 采用 Design Expert DX8.2 对米泔水用量、漂洗时间、漂洗温度等自变量进行二次项回归拟合, 得拟合方程为 $OD=0.970+0.065 A+0.042 B+0.100 C+0.022 AB+0.034 AC-0.110 BC-0.140 A^2-0.140 B^2-0.085 C^2$ ($r=0.926 0$, $P=0.000 2$), r 值较大, 说明该方程拟合度佳, 预测性好, $P<0.01$ 表示差异性极显著, 方差分析表见表 2; 绘制不同变量间的响应图见图 2。预测最优条件为米泔水用量为 9 倍、漂洗时间 55 h、漂洗温度 26 °C, 在此条件下, 白术内酯 I、II、III 的量预测值分别为 867.7、482.2、570.0 μg/g, 经加权折合综合评分, 归一化折合系数 OD 值为 0.960。

2.5 最佳工艺验证实验

选取 3 批次白术饮片, 按照优选的最佳工艺条件进行验证试验, 重复 3 次, 实验结果见表 3, 预测值与实际值偏差较小, 误差均在 ±5% 以内, 表明工艺预测性良好。

3 讨论

3.1 指标成分

苍术酮、白术内酯 I、II、III 为白术主要活性成分。苍术酮量较高, 是其主要燥性成分, 但其性质不稳定, 光照与加热条件下易分解为白术内酯 III 等^[3,20], 因此很难对苍术酮成分进行定量测定; 白术内酯 I、II、III 等性质稳定, 是白术的指标性成分,

表 1 炮制工艺优化的星点设计方案与结果

Table 1 Central composite design and results of process technology

试验号	A/倍	B/℃	C/h	$Y_1/(\text{mg}\cdot\text{g}^{-1})$	$Y_2/(\text{mg}\cdot\text{g}^{-1})$	$Y_3/(\text{mg}\cdot\text{g}^{-1})$	OD 值
1	4 (-1)	20 (-1)	24 (-1)	0.169	0.362	0.450	0.444
2	10 (+1)	20 (-1)	24 (-1)	0.190	0.343	0.367	0.420
3	4 (-1)	40 (+1)	24 (-1)	0.368	0.657	0.424	0.703
4	10 (+1)	40 (+1)	24 (-1)	0.451	0.562	0.393	0.710
5	4 (-1)	20 (-1)	72 (+1)	0.471	0.621	0.476	0.780
6	10 (+1)	20 (-1)	72 (+1)	0.495	0.705	0.487	0.838
7	4 (-1)	40 (+1)	72 (+1)	0.283	0.472	0.388	0.549
8	10 (+1)	40 (+1)	72 (+1)	0.423	0.677	0.419	0.749
9	2 (-1.732)	30 (0)	48 (0)	0.131	0.261	0.351	0.336
10	12 (+1.732)	30 (0)	48 (0)	0.473	0.560	0.395	0.725
11	7 (0)	13 (-1.732)	48 (0)	0.188	0.341	0.348	0.410
12	7(0)	47 (+1.732)	48 (0)	0.334	0.564	0.359	0.614
13	7(0)	30 (0)	8 (-1.732)	0.180	0.388	0.439	0.458
14	7(0)	30 (0)	88 (+1.732)	0.502	0.874	0.427	0.893
15	7(0)	30 (0)	48 (0)	0.592	0.930	0.461	0.994
16	7(0)	30 (0)	48 (0)	0.549	0.934	0.447	0.959
17	7(0)	30 (0)	48 (0)	0.559	0.910	0.496	0.974
18	7(0)	30 (0)	48 (0)	0.580	0.894	0.528	0.995
19	7(0)	30 (0)	48 (0)	0.570	0.848	0.537	0.971
20	7(0)	30 (0)	48 (0)	0.547	0.886	0.493	0.954

其中试验号为 15~20 号的实验组为重复实验

The run from 15 to 20 was the repeat experiments

表 2 方差分析表

Table 2 Analysis of variance

方差来源	平方和	自由度	F 值	P 值	方差来源	平方和	自由度	F 值	P 值
模型	0.890	9	13.90	0.000 2	A^2	0.270	1	37.45	0.000 1
A	0.059	1	8.27	0.016 5	B^2	0.290	1	41.17	0.000 0
B	0.024	1	3.39	0.095 5	C^2	0.010	1	14.54	0.003 4
C	0.140	1	19.40	0.001 3	残差	0.067	10		
AB	0.004	1	0.52	0.483 0	失拟项	0.065	5		
AC	0.009	1	1.32	0.277 2	纯误差	0.001	5		
BC	0.094	1	13.33	0.004 5	总离差	0.690	19		

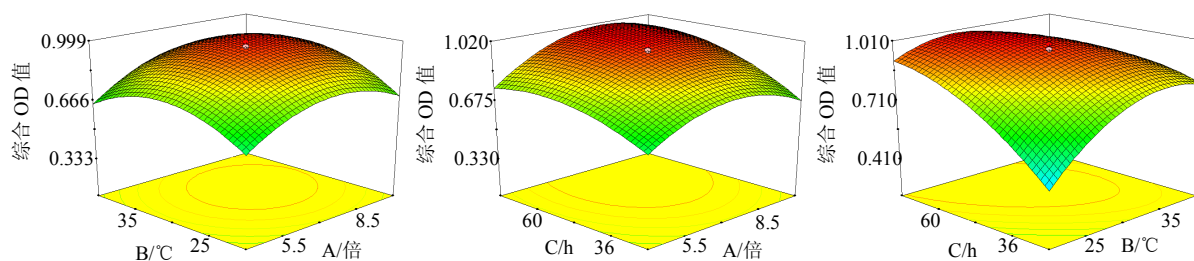


图 2 因素间的三维效应面图

Fig. 2 3D surface response of various factors

表 3 工艺验证

Table 3 Process validation

序号	$Y_1/(\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1})$	$Y_2/(\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1})$	$Y_3/(\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1})$
1	581.2	914.5	486.3
2	568.8	843.6	478.2
3	583.3	884.3	482.4

本实验结合白术提取工艺研究,将其进行加权评分,作为工艺评价指标,结果表明,该方法稳定可靠。

3.2 炮制工艺

实验表明,在米泔水漂白术炮制工艺中,随着温度的升高,白术内酯量增加,但漂洗泔水也因微生物的存在容易滋生发酵,发生一系列酵解反应,白术内酯类成分有所降低;酵解过程可能是其产生药效物质的主要过程,但漂洗时间太长会导致霉变影响药材品质。本实验结合古法,对米泔水进行 8 h 换 1 次的处理,工艺考察中采用恒温控制,得到最佳工艺参数为 26 ℃,而实际生产中一般在室温下进行操作,因此宜选择在春秋季节(南昌地区),日平均室温在 26 ℃左右较为合适,与古法炮制的要求一致。米泔水漂制古法一般漂 1~7 d^[16],本实验表明白术米泔水漂约 2.5 d 比较合适,漂洗时间太短,健脾成分量较低,漂洗时间太长,容易霉变,影响药材品质。米泔水用量太少,无法进行充分漂洗,过多会导致辅料的浪费,本实验在漂制中以 9 倍量的米泔水为最佳用量。

3.3 炮制特色

江西樟帮特色炮制源远流长,米泔水漂白术为樟帮特色品种,米泔水漂制传统方法一般仅凭经验,因此建立米泔水漂制炮制规范,传承古法技术,对于建立科学的饮片质量标准具有重要的意义。

本实验采用星点设计-效应面法进行米泔水漂白术炮制工艺设计,以米泔水用量、漂洗时间、漂洗温度为考察因素;以 HPLC 法测定白术内酯 I、II、III 等成分量,进行加权综合评分,优选得其最佳工艺,为米泔水漂白术的炮制工艺研究提供一定的依据,下一步应继续对米泔水漂白术的药效与炮制机制的相关性进行研究。

参考文献

[1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
[2] 南京中医药大学. 中药大辞典 [M]. 第 2 版. 上海: 上海科学技术出版社, 2006.

[3] 赵红红, 阎克里, 刘焕蓉. 氧化分解白术挥发油与羟基-β-环糊精包合工艺的研究 [J]. 中草药, 2015, 46(12): 1768-1773.
[4] Wang X, Li L, Ran X, et al. What caused the changes in the usage of *Atractylodes Macrocephalae Rhizoma* from ancient to current times [J]. *J Nat Med*, 2016, 70(1): 1-9.
[5] 龚千锋. 白术不同炮制品对其挥发油的研究 [J]. 江西中医药, 1987, 18(1): 54.
[6] 王文凯, 翁 萍, 张晓婷, 等. 建昌帮蜜糠炒白术炮制工艺优化 [J]. 中草药, 2015, 46(6): 857-860.
[7] 段 启, 许冬谨, 刘传祥, 等. 白术的研究进展 [J]. 中草药, 2008, 39(5): 800-802.
[8] 龚千锋. 樟树中药炮制全书 [M]. 南昌: 江西科学技术出版社, 1990.
[9] Endo K, Taguchi T, Taguchi F, et al. Antiinflammatory principles of *Atractylodes rhizomes* [J]. *Chem Pharm Bull*, 1979, 27(12): 2954-2958.
[10] 郝延军, 桑育黎, 李宝林, 等. 白术内酯 I 及白术内酯 III 对唾液淀粉酶活性的影响 [J]. 时珍国医国药, 2006, 17(9): 1617-1618.
[11] 李 伟, 文红梅, 崔小兵, 等. 白术健脾有效成分研究 [J]. 南京中医药大学学报, 2006, 22(6): 366-367.
[12] 王小珍. 白术内酯的提取分离、衍生化及对 PC12 细胞的保护作用 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2012.
[13] 汤德芳, 郝玉珩, 刘佐雅, 等. 平江白术根茎挥发油的成分及其抑瘤作用研究 [J]. 中国药学杂志, 1984, 19(9): 43-46.
[14] 孟振豪, 韩永红, 钟凌云. 星点设计-效应面法优选蜜糠炒白术的炮制工艺 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(15): 19-22.
[15] 姜 雯, 曾 诚, 于 宁, 等. 星点设计-效应面法优化天山雪莲提取物复合磷脂脂质体制备工艺 [J]. 中草药, 2016, 47(1): 57-64.
[16] 张钰祺, 龚千锋. 米泔水在中药炮制中的古今应用研究 [J]. 江西中医药, 2011, 42(4): 64-66.
[17] 王文凯, 张 正, 翁 萍, 等. 建昌帮米泔水漂苍术工艺研究 [J]. 时珍国医国药, 2015, 26(9): 2157-2159.
[18] 王建成. 白术中白术内酯 I、II、III 提取工艺优选 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(9): 28-30.
[19] 李 颖, 曾茂贵, 郑 笈, 等. 星点设计-效应面法优化鱼腥草挥发油-β-环糊精包合物的制备工艺 [J]. 中草药, 2014, 45(13): 1855-1862.
[20] Hikino H, Hikino Y, Yosioka I. Studies on the constituents of *Atractylodes*. IX. Structure and autoxidation of atractylon [J]. *Chem Pharm Bull*, 1964, 12(7): 755-760.