

正交试验优选甘遂醋制最佳工艺

李媛¹, 张丽¹, 单鸣秋¹, 丁安伟^{1,2*}

(1. 南京中医药大学药学院, 南京 210046; 2. 江苏省方剂研究重点实验室, 南京 210046)

[摘要] 目的: 确定醋甘遂饮片的最佳炮制工艺。方法: 以大戟二烯醇含量为指标, 醋的用量、炒制温度和炒制时间为考察因素, 采用正交试验优选醋甘遂饮片的最佳炮制工艺。结果: 醋的用量为 30%, 炒制温度控制在 260 ℃, 炒制时间为 7 min。结论: 优选出的醋甘遂炮制工艺稳定可行, 重现性好。

[关键词] 醋甘遂; 炮制工艺; 正交试验

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)07-0004-03

Optimization of Preparation Processing Technique of Kansui Radix Stir-baked with Vinegar by Orthogonal Experiment

LI Yuan¹, ZHANG Li¹, SHAN Ming-qiu¹, DING An-wei^{1,2*}

(1. Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China;

2. Jiangsu Key Laboratory for Traditional Chinese Medicine Formulae Research, Nanjing 210046, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the best processing technique of Kansui Radix stir-baked with vinegar. **Method:** The best processing technique was gained through determining the content of euphol by HPLC as the index, and orthogonal design experiment was used to investigate the factors of vinegar amount, baked time and temperature. **Result:** The best processing technique was to add 30% vinegar and bake 7 minutes at 260 ℃. **Conclusion:** This best processing technique is stable, feasible with good repetition.

[Key words] Kansui Radix stir-baked with vinegar; processing technique; orthogonal design

甘遂为大戟科大戟属植物甘遂 *Euphorbia kansui* T. N. Liou ex T. P. Wang 的干燥块根^[1], 具有泻水逐饮的功效, 系有毒中药, 生品仅限外用, 内服必须炮制。常用的炮制方法有醋甘遂、甘草制甘遂、煨甘遂、土炒甘遂、豆腐煮甘遂等^[2]。目前甘遂的炮制工艺多以醋制为主, 但没有具体的量化参数, 多以成品的外观性状作为炮制的唯一参考指标。文献研究表明甘遂中含有大量的大戟二烯醇^[3], 并作为 2010 年版《中国药典》甘遂含量测定项下指标, 但未见以该

成分为指标对甘遂醋制工艺进行研究的报道。因此, 本试验采用 $L_9(3^4)$ 正交试验法, 通过对不同工艺中大戟二烯醇含量的测定, 对醋甘遂炮制过程中辅料用量、炒制温度和炒制时间等影响因素进行研究, 以期筛选甘遂饮片炮制的最佳条件。

1 材料

1.1 仪器 Waters 515 高效液相色谱仪配 Waters 2996DAD 检测器, Waters 717 自动进样器, Empower 色谱工作站(美国沃特斯公司), Anke TGL-16B 离心机, Sartorius BP211D 型电子天平。

1.2 试药 甘遂药材购自陕西宝鸡赤沙乡, 经南京中医药大学吴启南教授鉴定为大戟科植物甘遂 *E. kansui* 的干燥块根。

大戟二烯醇(自制, HPLC 测定纯度为 98.11%)、甲醇(色谱纯)、乙腈(色谱纯, 美国 Fisher 公司), 水为重蒸水, 其余试药均为分析纯。

[收稿日期] 20101014002

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30973940)

[第一作者] 李媛, 硕士研究生, Tel: 13951671265, E-mail: liyuan4252@126.com

[通讯作者] * 丁安伟, 教授, 博士生导师, Tel: 13951916435, E-mail: awding105@163.com

2 方法与结果

2.1 甘遂中大戟二烯醇的含量测定

2.1.1 色谱条件 Agilent XDB C₈ 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm); 流动相乙腈-水(93:7), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 210 nm, 柱温 38 ℃。见图 1。

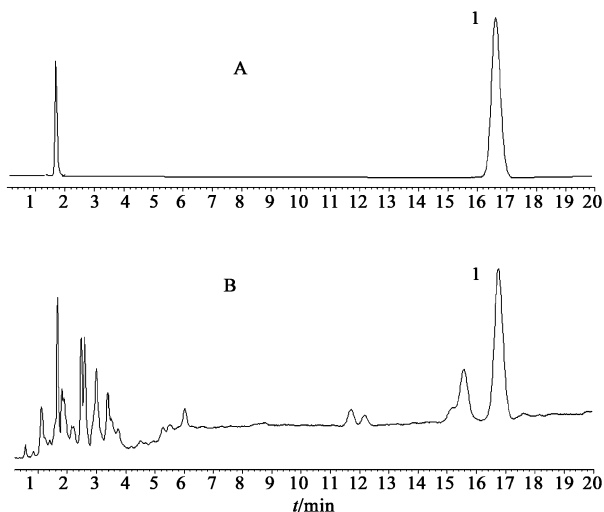


图 1 醋甘遂中大戟二烯醇 HPLC

A. 对照品; B. 样品; 1. 大戟二烯醇

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取 50 ℃ 减压干燥至恒重的大戟二烯醇对照品 11.52 mg, 置 5 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得 2.304 g·L⁻¹ 的对照品储备液。

2.1.3 供试品溶液的制备 取供试品粉末(过 65 目筛) 2 g, 精密称定, 置 50 mL 具塞锥形瓶中, 精密加入乙酸乙酯 25 mL, 密塞, 称质量, 超声(功率 250 W, 频率 50 kHz) 处理 40 min 后再称重, 以乙酸乙酯补足损失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液 10 mL, 蒸干, 残渣加甲醇溶解并转移至 10 mL 量瓶中, 稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.1.4 线性关系考察 精密量取对照品储备溶液适量, 分别制成 0.115 2, 0.230 4, 0.460 8, 0.691 2, 0.921 6 g·L⁻¹ 系列的对照品溶液。精密吸取各对照品溶液 10 μL。按 2.1.3 项下色谱条件, 注入液相色谱仪, 测得峰面积。以峰面积(Y) 为纵坐标, 对照品质量浓度(X, g·L⁻¹) 为横坐标, 绘制标准曲线, 计算回归方程为 $Y = 1\,922\,159X - 77\,306.1$ ($r = 0.999\,7$)。大戟二烯醇的进样量在 1.152 ~ 9.216 μg 呈良好的线性关系。

2.1.5 精密度考察 在上述色谱条件下, 以质量浓度 0.691 2 g·L⁻¹ 的对照品溶液为考察对象, 连续进

样 6 次, 测定峰面积, RSD 2.6%, 表明精密度良好。

2.1.6 稳定性试验 将上述供试品溶液 5 号, 在上述色谱条件下于 0, 2, 4, 6, 8 h 分别进样 10 μL, 测定峰面积。结果大戟二烯醇的峰面积的 RSD 2.4%。

2.1.7 重复性试验 取同一供试品(5 号) 2 g, 精密称定, 按照 2.3.3 项下方法制得供试品溶液 6 份, 在上述色谱条件下进行测定, 根据峰面积计算含量, 结果大戟二烯醇的平均质量分数 4.242 mg·g⁻¹, RSD 2.4%。

2.1.8 加样回收率试验 称取已知含量的醋甘遂粉末(过 65 目筛) 6 份, 每份 1 g, 精密称定, 精密加入大戟二烯醇对照品 1 mL, 按 2.3.3 项制成供试品溶液, 在上述色谱条件下进样分析, 计算回收率。结果大戟二烯醇的加样回收率 97.7%, RSD 0.9%。结果见表 1。

表 1 大戟二烯醇加样回收率考察

No.	称样量 /g	样品含量 /mg	加标量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%
1	1.040 0	4.440	2.304	6.705	98.3
2	1.037 0	4.427	2.304	6.683	97.9
3	1.010 0	4.312	2.304	6.579	98.4
4	1.050 0	4.483	2.304	6.720	97.1
5	1.034 0	4.415	2.304	6.630	96.2
6	1.039 0	4.436	2.304	6.697	98.1

2.2 炮制工艺正交优选 选择辅料用量、炒制温度与炒制时间为考察因素, 各因素 3 个水平, 选用 L₉(3⁴) 正交表, 见表 2。取 9 份大小均一的净甘遂饮片各 25 g, 按表 3 安排试验, 加入不同比例的醋拌匀, 闷透, 待醋吸干, 于电磁炉上用铁锅炒制, 将锅加热到一定温度, 投药, 不断翻炒, 以红外线测温仪测量铁锅底部的温度, 炒至一定程度时, 取出, 放凉。共炒制得 9 份醋甘遂样品。方差分析见表 4。

表 2 醋甘遂炮制的因素水平

水平	A 辅料用量/%	B 温度/℃	C 时间/min
1	20	220	5
2	30	260	7
3	40	300	9

由表 3 中极差 R 值大小显示, 各因素作用次序为 A > B > C, 影响甘遂饮片炮制的主要因素依次为辅料用量、炒制温度和炒制时间。故最佳炮制工艺以 A₂B₂C₂ 组合为佳, 即醋的用量 30%, 炒制温度控

表 3 醋制甘遂炮制工艺正交试验

No.	A	B	C	D	大戟二烯醇 /mg·g ⁻¹
1	1	1	1	1	2.754
2	1	2	2	2	3.014
3	1	3	3	3	2.311
4	2	1	2	3	3.964
5	2	2	3	1	4.269
6	2	3	1	2	3.459
7	3	1	3	2	3.245
8	3	2	1	3	3.980
9	3	3	2	1	3.879
K ₁	8.078 5	9.962 3	10.192 2	10.902 2	
K ₂	11.691 7	11.263 1	10.856 4	9.717 1	
K ₃	11.104 2	9.649 0	9.825 8	10.255 1	
R	3.613 2	1.614 1	1.030 6	1.185 0	

表 4 大戟二烯醇质量分数方差分析

误差来源	SS	f	S	F
A	2.506 2	2	1.253 1	10.677 5
B	0.488 4	2	0.244 2	2.080 8
C	0.181 9	2	0.091 0	0.775 1
D(误差)	0.234 7	2	0.117 4	

注: $F_{0.05}(2, 2) = 19.00$ 。

制在 260 ℃, 炒制时间为 7 min。

3 讨论

按上述最佳炮制工艺制备醋甘遂 3 份, 依 2.3.3 项下供试品溶液的制备, 测得大戟二烯醇含量为 4.290 mg·g⁻¹, 且性状符合药典标准, 本试验优选出的醋甘遂炮制工艺合理。

文献研究表明甘遂中三萜类成分具有抗肿瘤活性, 其中大戟二烯醇对 12-O-十四(烷)酰大戟二烯醇-13-乙酸酯(TPA)激活的爱-巴病毒早期抗原具有抑制作用^[4], 对 TPA 诱导的小鼠皮肤癌有显著抑制作用^[5]。此外, 大戟二烯醇还具有显著抑制炎症渗出增加及炎症组织中炎症介质的释放而具有明显的抗

炎作用^[6]和明显的降压活性^[7]。因此, 本试验采用大戟二烯醇作为工艺研究的考察指标。

在进行色谱分析时, 经紫外全波长扫描图谱分析, 确定 210 nm 为大戟二烯醇吸收峰的检测波长。采用 Agilent C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 以甲醇-水为流动相进行洗脱, 待测成分大戟二烯醇与其他成分无法得到分离。改用 Agilent XDB C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm), 以乙腈-水为流动相进行洗脱, 分离效果良好。分别采用乙腈-水(95:5)、乙腈-水(93:7)为流动相进行试验, 乙腈-水(93:7)获得较好的分离效果。

[参考文献]

- [1] 中国药典. 一部[S]. 2010: 81.
- [2] 叶定江. 中药学炮制学辞典[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2005: 236.
- [3] 潘勤. 甘遂的化学成分研究[D]. 南京: 中国药科大学博士学位论文, 2003: 6.
- [4] Toshihiro Akihisa, E M Kithsiri Wijeratne, Harukuni Tokuda, et al. Eupha-7, 9(11), 24-trien-3β-ol (“Antiquol C”) and other triterpenes from *euphorbia antiquorum* latex and their inhibitory effects on epstein-barr virus activation [J]. J Nat Prod, 2002, 65(2), 158.
- [5] Yasukawa K, Akihisa T, Yoshida Z Y, et al. Inhibitory effect of euphol, a triterpene alcohol from the roots of *Euphorbia kansui*, on tumour promotion by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in two-stage carcinogenesis in mouse skin[J]. J Pharm Pharmacol, 2000, 52(1): 119.
- [6] Sarang Ban, Prabhavathy Devan, Beenish Khan, et al. Euphol, an inhibitor of proinflammatory cytokines and mediators in rat model of pleurisy [C]. 6th oxford international conference on the science of botanicals (ICSB), 2007.
- [7] Singh G B, Sharma M L, Suri O P, et al. Hypotensive activity of 8, 24-euphadien-3β-ol (euphol)[J]. J. Planta Medica, 1989, 55(6): 500.

[责任编辑 全燕]