



多指标正交试验法优选京大戟醋制工艺

孙立立*, 张乐林, 石典花

(山东省中医药研究院, 山东 济南 250014)

[摘要] 目的: 优选京大戟最佳醋制工艺。方法: 采用 $L_9(3^4)$ 正交设计试验, 以用醋量、醋水比例、煮制火候作为考察因素, 以大戟二烯醇含量、醇浸出物、水浸出物、饮片外观、断面性状多指标综合加权评分为指标, 优选京大戟炮制工艺。结果: 优选出京大戟最佳炮制工艺为每 100 g 药材加入醋 30 g 和水 270 g 的醋水混合液, 拌匀, 闷润, 文火煮至醋水被吸尽, 取出, 晾至 6~7 成干, 切厚片。结论: 本研究制定了京大戟炮制工艺量化技术参数, 在该工艺技术条件下可生产出质量稳定可控的醋京大戟饮片。

[关键词] 京大戟; 醋制工艺; 多指标; 正交试验

京大戟为大戟科大戟属植物大戟 *Euphorbia pekinensis* Rupr. 的干燥根, 多年生草本植物, 春季未发芽前, 或秋季茎叶枯萎时采挖, 除去残茎及须根, 洗净, 晒干。京大戟是我国传统常用有毒中药, 其性寒, 味苦, 有毒, 归肺、脾、肾经, 具有泻水逐饮、消肿散结的作用, 用于水肿胀满、胸腹积水、痰饮积聚、气逆喘咳、二便不利等^[1]。京大戟生用有毒, 对人体皮肤、黏膜及胃肠有较强的刺激性, 服用过量易引起咽喉肿胀、充血及腹泻^[2], 因此必须经过炮制加工处理方能降低或消除毒副作用。历代本草记载京大戟的炮制方法有 10 余种, 沿用至今以醋制法为主, 并为历版药典所收载。京大戟作为泻水逐饮的要药, 醋制可显著降低其毒性, 2010 年版《中国药典》规定京大戟炮制用醋量为每 100 kg 药材用醋 30 kg, 但对其工艺参数未有具体要求, 因此, 各地对醋京大戟炮制程度的掌握也因人因地操作不同而不尽相同, 炮制品质量多以成品的外观性状为参考标准, 无其他量化参数, 为优化和规范其炮制工艺, 本实验对醋京大戟的炮制工艺进行了优选, 以保证醋京大戟饮片的质量。

1 材料

Waters 2695 型高效液相色谱仪 (Waters 2996 DAD 检测器, Waters 2695 四元梯度泵); Empower 色谱数据工作站; 电热恒温鼓风干燥箱 (上海精密实

验设备有限公司); Raytek 红外测温仪-ST80 (北京雷泰光电技术有限公司); 电子万用炉 (北京市永光明医疗仪器厂)。

京大戟购自安徽省亳州药材市场, 经山东省中医药研究院中药资源研究室主任林慧彬研究员鉴定为药典收载品种大戟科大戟属植物大戟 *E. pekinensis* 的干燥根; 大戟二烯醇 (自制, 纯度 99.21%); 乙腈为色谱纯, 其余均为分析纯, 水为纯净水。

2 方法与结果

2.1 试验设计 正交试验的因素、水平设计见表 1。

表 1 京大戟醋制工艺因素水平表

Table 1 Factors and levels of vinegar processing of *Euphorbia pekinensis*

	A	B	C
水平	用醋比例 /%	醋水比	煮制火候
1	20	1:6	文火(200℃)
2	30	1:9	中火(300℃)
3	40	1:12	武火(400℃)

2.2 醋京大戟饮片的制备 取京大戟药材 100 g, 共 9 份, 置煮制容器内, 按正交设计方案制备, 加入相应量的醋水混合液拌匀, 闷润 1 h, 于电子万用炉上控制火候, 加热煮至醋水液被吸尽, 取出, 晾至 6~7 成干时切厚片, 晾干。

2.3 外观质量选择依据 传统质量评价是中药炮制历代经验的总结, 是目前单一化学成分或化学部位不能替代和说明的评价标准, 因此选其作为正交

[稿件编号] 20111221013

[基金项目] 中医药行业科研专项(200807039)

[通信作者] * 孙立立, 研究员, 主要从事中药新药开发和中药炮制原理研究, Tel: (0531) 82949829, E-mail: xingerx@163.com



试验的主要评价指标之一。外观性状评分分为外观和断面色泽 2 部分进行评分。外观色泽评分标准:黑褐色 50~45 分,焦褐色 45~40 分,深褐色 40~35 分,褐色 35~30 分,浅褐色 30~20 分;断面色泽评分标准:焦黄色 50~45 分,黄褐色 45~40 分,深黄

色 40~35 分,棕黄色 35~30 分,浅棕黄色 30~20 分。将正交 1~9 号醋京大戟饮片,送交 3 名经验丰富的老药工,以传统京大戟饮片外观及断面色泽为标准,对饮片进行打分,计算各饮片得分平均值即为该饮片得分,结果见表 2。

表 2 各指标质量分数及得分情况

Table 2 The content and score of each index

No.	大戟二烯醇		水浸出物		醇浸出物		外观性状	
	质量分数/mg · g ⁻¹	得分	质量分数/mg · g ⁻¹	得分	质量分数/mg · g ⁻¹	得分	评分	得分
1	7.23	80.24	254.17	89.74	176.80	81.61	55	57.89
2	6.93	76.91	253.98	89.68	165.71	76.49	45	47.37
3	7.29	80.91	270.38	95.47	179.88	83.03	60	63.16
4	7.37	81.80	273.28	96.49	178.97	82.61	70	73.68
5	8.63	95.78	267.78	94.55	216.65	100.0	85	89.47
6	9.01	100.0	283.22	100.0	198.93	91.82	95	100.0
7	7.66	85.02	276.97	97.79	196.39	90.65	65	68.42
8	8.48	94.12	277.92	98.13	189.60	87.51	85	89.47
9	8.40	93.23	274.91	97.07	178.18	82.24	75	78.95

注:各指标得分均为以各测定值与相应最高值之比乘 100 所得。

2.4 浸出物选择依据 京大戟中主要有效成分存在于醇浸出物中,而临床用药多以水煎液为主,所以同时选择京大戟的醇浸出物和水浸出物作为指标之一。采用冷浸法、热浸法进行考察比较,热浸法所得浸出物含量高于冷浸法,故选用热浸法,分别以水及乙醇作为提取溶剂,按 2010 年版《中国药典》热浸法(附录 X A)规定项下方法进行测定。结果见表 2。

2.5 大戟二烯醇选择依据 大戟属植物的毒性与其所含的二萜酯类密切相关^[3],京大戟中具体的毒性成分目前尚不明确,在前期研究发现京大戟炮制后更易于三萜类成分大戟二烯醇的煎出。大戟二烯醇为大戟属植物的特征性成分^[4],也被认为是京大戟中的主要药效成分,该成分在药材中含量较高,且具有抗炎^[5]、抗病毒^[6]、抗动脉粥样硬化^[7]等药理活性,因此选择其为正交试验的主要指标之一。

2.6 大戟二烯醇含量测定 汉邦 Benetnack C₈ 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm);流动相乙腈-0.2% 磷酸溶液(83:17);检测波长 203 nm;流速 1 mL · min⁻¹;柱温 30 °C。进样量 10 μL。在上述色谱条件下,大戟二烯醇理论塔板数达 5 000 以上。色谱图见图 1。

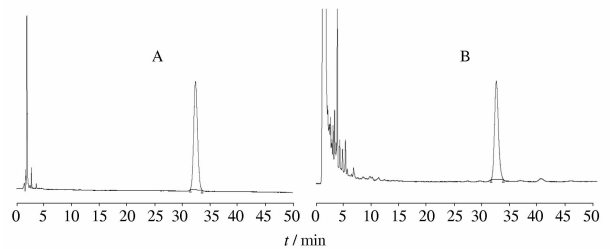


图 1 大戟二烯醇(A)和醋京大戟样品(B)的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC chromatograms of euphol (A) and Euphorbiae Pekinensis Radix stir-baked with vinegar (B)

精密称取干燥至恒重的大戟二烯醇对照品 9.56 mg,置 10 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,作为对照品储备液。精密吸取对照品储备液 1 mL 至 10 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,即得大戟二烯醇对照品溶液(0.095 6 g · L⁻¹)。

取净制后京大戟药材适量,粉碎,过 40 目筛,取样品粉末 0.5 g,精密称定,置圆底烧瓶中,加甲醇 25 mL,称定质量,水浴加热回流提取 1 h,取下,放凉后称定,用甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,用 0.45 μm 微孔滤膜过滤,备用。

精密吸取大戟二烯醇对照品溶液 5, 10, 15, 20, 25, 30 μL,按上述色谱条件测定,以大戟二烯醇进样



量(μg)为横坐标,峰面积为纵坐标绘制标准曲线,计算线性回归方程为 $y = 2\ 000\ 000x - 87\ 856$, $r = 0.999\ 9$;进样量在 $0.47 \sim 2.85\ \mu\text{g}$ 与峰面积呈良好的线性关系。

精密吸取对照品溶液,按上述色谱条件测定,连续进样5次,结果大戟二烯醇峰面积的RSD 0.49%,表明精密度良好。

取同一供试品溶液,分别在0,2,4,6,8,10 h,按上述色谱条件测定,结果供试品溶液中大戟二烯醇峰面积的RSD 0.46%,表明供试品溶液至少在10 h内稳定。

按加样回收法,取京大戟药材粉末6份,每份0.25 g,精密称定,分别加入一定量大戟二烯醇对照品,按供试品溶液制备方法制备,按上述色谱条件测定,结果大戟二烯醇的平均回收率为99.96%,RSD 0.97%,表明该法测定结果准确。

取9份正交工艺制备的醋甘遂饮片,分别按供试品溶液制备方法制备,按上述色谱条件测定,结果见表2。

2.7 综合评分 权衡传统外观质量、大戟二烯醇含量和浸出物量对醋京大戟饮片质量的影响,确定大戟二烯醇含量的加权系数定为0.4,外观性状加权系数定为0.3,水浸出物和醇浸出物加权系数各定为0.15,采用综合评分法,综合评分按以下公式计算:综合质量评分 = 大戟二烯醇含量得分 \times 0.4 + 外观性状得分 \times 0.3 + 水浸出物量得分 \times 0.15 + 醇浸出物量得分 \times 0.15。综合评分结果见表3,方差分析见表4。影响京大戟醋制工艺的因素依次为 $A > C > B$,且用醋量具有显著性影响($P < 0.05$),故 A_2 为醋制工艺主要影响因素水平,即每100 g 药材加醋30 g;由直观分析结果可见,煮制火候因素中各水平大小顺序为 $C_1 > C_3 > C_2$,结合京大戟传统炮制工艺中小火煮制的要求以及节约经济方面考虑,选择煮制火候因素中的 C_1 水平,即文火煮制;由方差分析结果可见,醋水混合比例对实验结果没有显著性影响,查阅各地炮制规范可知,各地炮制要求均为加水量没过京大戟药材表面即可,经实验考察可知,当加醋量为30%,醋水比例1:9时即可达到此标准,故选择 B_2 因素水平,即加醋与加水的比例为1:9。综合直观分析和方差分析结果,优化的京大戟醋制工艺参数为 $A_2 B_2 C_1$,即每100 g 药材加入30%醋,醋水比为1:9的醋水混合液,拌匀,闷润,文火加热

煮至醋水液被吸尽,取出,晾至6~7成干时切厚片,晾干,即得。

表3 $L_9(3^4)$ 正交试验结果及直观分析表

Table 3 The results of $L_9(3^4)$ orthogonal test and visual analysis

No.	大戟二烯醇含量得分	水浸出物得分	醇浸出物得分	外观性状得分	综合评分
1	80.24	89.74	81.61	57.89	75.17
2	76.91	89.68	76.49	47.37	69.90
3	80.91	95.47	83.03	63.16	78.09
4	81.80	96.49	82.61	73.68	81.69
5	95.78	94.55	100.00	89.47	94.34
6	100.00	100.00	91.82	100.00	98.77
7	85.02	97.79	90.65	68.42	82.80
8	94.12	98.13	87.51	89.47	92.34
9	93.23	97.07	82.24	78.95	87.87

表4 方差分析表

Table 4 Variance analysis

因素	偏差平方和	F	P
A	488.191	69.722	<0.05
B	109.024	15.570	<0.1
C	121.123	17.298	<0.1
误差	7.00		

注: $f=2; F_{0.05}(2,2) = 19.00$ 。

2.8 验证试验 为验证该工艺的稳定性,按优选出的最佳工艺 $A_2 B_2 C_1$ 进行验证性实验,结果见表5。结果表明优选的炮制工艺合理可行,制备出的醋京大戟饮片质量稳定。

2.9 急性毒性比较 京大戟醋制的目的是为了降低毒性,前期研究结果表明京大戟的毒性部位为乙酸乙酯部位,为验证优选的最佳醋制工艺是否达到减毒的目的,对京大戟、醋京大戟的乙酸乙酯部位进行了急性毒性比较试验。京大戟生品 LD_{50} 和95%可信限分别为160.3,142.5~180.3 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$;醋制品 LD_{50} 和95%可信限分别为234.8,209.7~262.8 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

4 讨论

本研究首次采用多指标对京大戟的炮制工艺进行优选,以京大戟中特征性成分大戟二烯醇、水浸出物、醇浸出物和传统外观质量为指标,对影响京大戟炮制质量的加醋量、醋水比例、煮制火候3个因素进行考察,经直观分析和方差分析得出,影响京大戟



表5 京大戟醋制工艺验证试验质量考察

Table 5 The quality inspection results of *Euphorbiae Pekinensis Radix* stir-baked with vinegar which were prepare in validation test

No.	外观及断面	大戟二烯醇 /mg · g ⁻¹	水浸出物 /mg · g ⁻¹	醇浸出物 /mg · g ⁻¹	水分 /%	总灰分 /%	酸不溶性灰分 /%
1	表面焦褐色,断面焦黄色	8.894	321.313	204.244	7.19	5.96	0.95
2	表面焦褐色,断面焦黄色	8.947	318.003	202.068	7.07	5.96	0.98
3	表面焦褐色,断面焦黄色	8.918	319.859	200.492	7.04	6.00	0.99

醋制因素为用醋量 > 煮制火候 > 醋水比例, 优选的醋制工艺为 A₂B₂C₁, 即每 100 g 药材加入 30 g 醋和 270 g 水的醋水混合液, 拌匀, 闷润, 文火加热煮至醋水液被吸尽, 取出, 晾至 6 ~ 7 成干时切厚片, 晾干。验证性实验表明此工艺合理、可行, 制备出的醋京大戟饮片质量稳定可控。为验证炮制对京大戟毒性的影响, 本研究对京大戟和采用最佳醋制工艺制备的醋京大戟进行了急性毒性试验对比研究, 结果发现京大戟的 LD₅₀ 为 160.3 g · kg⁻¹, 醋京大戟的 LD₅₀ 为 234.8 g · kg⁻¹, 说明京大戟经醋炙后毒性明显降低, 进一步验证了该工艺的合理可行性。

[参考文献]

[1] 中国药典. 一部[S]. 2010:209.
 [2] 窦志华, 丁安伟. 大戟属有毒中药毒性成分及炮制减毒研究进展[C]. 淄博: 中华中医药学会第六届中药炮制学术会议,

2006:226.
 [3] 师严平, 贺志军, 贾忠建. 大戟二萜结构及其生理活性研究进展(I) [J]. 天然产物研究与开发, 1998, 11(5):85.
 [4] 高羽, 梁侨丽, 戴传超, 等. 大戟属 4 种植物中大戟醇的含量测定[J]. 时珍国医国药, 2010(5):1051.
 [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] Toshihiro Akihisa, E M Kithsiri W ijeratne, 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):160.
 [7] 史大永, 韩丽君, 孙杰, 等. 绿藻基根硬毛藻的化学成分及其活性[J]. 中国中药杂志, 2005, 30(15):1165.

Optimization of vinegar processing technique of *Euphorbia pekinensis* by multi-index orthogonal test

SUN Lili*, ZHANG Lelin, SHI Dianhua

(Shandong Academy of Chinese Medicine, Ji'nan 250014, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize the vinegar processing technique of *Euphorbia pekinensis*. **Method:** The test was designed by using orthogonal table L₉(3⁴). The factors were vinegar amount, proportion of vinegar and water and duration and degree of heating. An aggregative weighted method was used to optimize processing technology of *E. pekinensis* with content of euphol, extract of ethanol, extract of water and appearance and section were used as evaluative indicators. **Result:** The optimal processing of *E. pekinensis* was identified as adding the mixture of 30 g vinegar and 270 g water to 100 g herbs, mixing evenly and softening, cooking until exhaustion under slow fire, taking out and drying to degree 6-7, and then cutting into thick slices. **Conclusion:** The study defines parameters of the processing technique of *E. pekinensis*. The quality of *E. pekinensis* is stable and controllable under the technical conditions.

[Key words] *Euphorbiae pekinensis*; vinegar processing technology; multi-index; orthogonal test

doi:10.4268/cjcm20121113

[责任编辑 马超一]