

中图分类号: R932; R284.2 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2023)09-0033-04
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2023.09.008



正交试验优选十枣汤的提取工艺*

洪博, 刘军, 林宇, 刘哲丞, 刘荣宏, 李文静[△]

(齐齐哈尔医学院药学院, 黑龙江 齐齐哈尔 161000)

摘要:目的 优选十枣汤的提取工艺。方法 以十枣汤中大戟二烯醇的含量及干膏得率的综合评分为评价指标, 在单因素试验基础上, 采用 $L_9(3^4)$ 正交试验考察加水量、提取时间和提取次数对十枣汤提取工艺的影响。结果 最佳提取工艺为提取2次, 提取时间为1.5 h, 加入10倍量水。验证试验结果显示, 5份样品中大戟二烯醇的平均含量为0.99 mg/g, RSD为1.24% ($n=5$); 平均干膏得率为44.01%, RSD为1.64% ($n=5$)。结论 优选的提取工艺合理、可行。

关键词: 十枣汤; $L_9(3^4)$ 正交试验; 提取工艺; 大戟二烯醇; 干膏得率

Optimization of Extraction Process of Shizao Decoction by the Orthogonal Test

HONG Bo, LIU Jun, LIN Yu, LIU Zhecheng, LIU Ronghong, LI Wenjing

(School of Pharmacy, Qiqihar Medical University, Qiqihar, Heilongjiang, China 161000)

Abstract: Objective To optimize the extraction process of Shizao Decoction. **Methods** With the comprehensive score of the content of euphadienol and the dry extract yield in Shizao Decoction as the indexes, the effects of water addition amount, extraction time and extraction times on the extraction process of Shizao Decoction were investigated through the $L_9(3^4)$ orthogonal test on the basis of the single factor test. **Results** The optimal extraction process was as follows: extracting twice, 1.5 h each time, and adding 10 times the amount of water. The validation test result showed that the average content of euphadienol in five samples was 0.99 mg/g, with an RSD of 1.24% ($n=5$). The dry extract yield was 44.01%, with an RSD of 1.64% ($n=5$). **Conclusion** The optimal extraction process is reasonable and feasible.

Key words: Shizao Decoction; $L_9(3^4)$ orthogonal test; extraction process; euphadienol; dry extract yield

肝硬化腹腔积液俗称肝腹水, 是由于肝细胞变性、坏死、再生, 促使纤维组织增生和瘢痕收缩, 致使肝脏质地变硬形成肝硬化, 引起门静脉高压、肝功能损害, 导致腹水生成。约67.3%的住院肝硬化患者伴有肝腹水, 其5年病死率高达44%^[1-2]。目前, 肝腹水的治疗主要为利尿、低钠、补充白蛋白等, 但存在电解质紊乱、诱发肝性脑病、顽固性腹水等问题^[3]。中医中药治疗肝腹水具有独特优势, 多从肝脾肾论治, 注重调节与恢复气血水的功能^[4-5]。十枣汤始载于东汉张仲景的《伤寒杂病论》, 为泻下剂, 具有攻逐水饮之功效^[6-7], 主治悬饮, 咳唾胸胁引痛, 临床常用于治疗渗出性脑膜炎、结核性胸膜炎、肝硬化、慢性肾炎所致的胸腔积液、腹水或全身水肿, 以及晚期血吸虫病所致腹水等属水饮内停里实证者^[8]。由芫花、甘遂、大戟、大枣组方, 为峻下逐水之药, 以大戟二烯醇为代表的四环三萜类化合物为其主要特征性活性成分, 具有抗肝腹水、抗炎、降血压等作用^[9]。方中芫花辛温有毒、善消胸胁之水^[10-11], 甘遂苦寒有毒、善行经隧水湿^[12-13], 大戟苦寒有毒、善泻六腑之水^[14-15], 共为君药; 大枣补中益气、扶正, 养心安神, 能缓和多种猛烈中药的毒性^[16], 为佐使药。本研究中以大戟二烯醇含量和干膏得率的综合评分为评价指标,

在单因素试验基础上, 采用正交试验对十枣汤提取工艺中的加水量、提取时间、提取次数进行考察, 优选十枣汤的提取工艺。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

SHIMADZU LC-30AD型超高效液相色谱仪(日本岛津公司); ME155DU型精密天平(瑞士梅特勒-托利多公司, 精度为0.01 mg); SCT型数显搅拌电热套(菏泽市精科仪器有限公司)。

1.2 试剂

大戟(批号为20210324), 芫花(批号为20210427), 甘遂(批号为20210612), 大枣(批号为20210728), 均购自齐齐哈尔市鑫金龙中药房(景新街店), 经齐齐哈尔医学院药学院郭丽娜教授鉴定分别为大戟的干燥根、芫花的干燥花蕾、甘遂的干燥块根和大枣的成熟果实, 均符合2020年版《中国药典(一部)》中相关规定; 大戟二烯醇对照品(信阳市中检计量生物科技有限公司, 批号为D06711809002, 含量为99.0%); 十枣汤(实验室自制, 批号分别为20220101, 20220102, 20220103, 20220104, 20220105, 20220106, 20220107, 20220108, 20220109, 20220110); 甲醇、乙腈(色谱纯, 美国天地有

*基金项目: 黑龙江省卫生健康委员会科研课题[20210202040072]。

第一作者: 洪博, 女, 博士, 讲师, 研究方向为中药材化学成分, (电子信箱)bohong200630174@163.com。

[△]通信作者: 李文静, 男, 博士, 副教授, 研究方向为中药质量标准, (电子信箱)lwj022325@163.com。

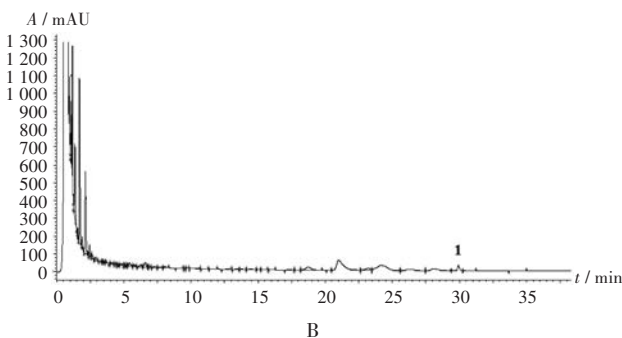
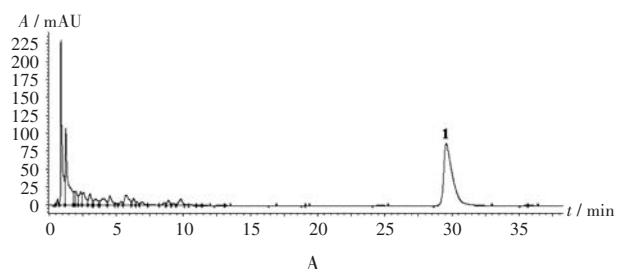
限公司);蒸馏水(屈臣氏集团);甲酸(色谱纯,北京迪马科技有限公司)。

2 方法与结果

2.1 大戟二烯醇含量测定

2.1.1 色谱条件及系统适用性试验

色谱柱:Waters T3 C₁₈柱(100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm);流动相:乙腈 - 0.1% 甲酸水溶液(90:10, V/V);流速:0.3 mL/min;检测波长:254 nm;柱温:40 °C;进样量:10 μL。供试品溶液色谱中,大戟二烯醇色谱峰与最近组分的分离度大于1.5,理论板数按大戟二烯醇峰计应不低于4 500,拖尾因子0.95 ~ 1.05。色谱图见图1。



1. 大戟二烯醇

A. 对照品溶液 B. 供试品溶液

图1 高效液相色谱图

1. Euphadienol

A. Reference solution B. Test solution

Fig. 1 HPLC chromatograms

2.1.2 溶液制备

取大戟二烯醇对照品8.02 mg,精密称定,加甲醇溶解,定容于10 mL容量瓶中,即得对照品溶液。取芫花、甘遂、大戟、大枣各3.00 g,精密称定,加100 mL蒸馏水冷凝回流煎煮30 min,去渣,0.22 μm微孔滤膜滤过,即得十枣汤水提液,作为供试品溶液。

2.1.3 方法学考察

线性关系考察:精密量取对照品溶液适量,加甲醇稀释成质量浓度分别为6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200, 400 μg/mL的系列标准溶液,吸取上述标准溶液各10 μL,按2.1.1项下色谱条件进样测定。以大戟二烯醇质量浓度(X , μg/mL)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标绘制标准曲线,得回归方程 $Y = 4\ 102.2X - 7\ 636.5$ ($r = 0.999\ 6$, $n = 7$)。结果表明,大戟二烯醇质量浓度在6.25 ~

400 μg/mL范围内与峰面积线性关系良好。

检测限与定量限确定:选择线性关系考察项下最小质量浓度的样品稀释10倍为方法的定量限,结果为0.625 μg/mL;稀释3倍为方法的检测限,结果为0.208 μg/mL。

精密度试验:分别精密吸取质量浓度为6.25, 25, 100 μg/mL的对照品溶液各10 μL,按2.1.1项下色谱条件进样测定6次,记录峰面积。结果低、中、高质量浓度大戟二烯醇色谱峰面积的RSD分别为1.12%, 0.70%, 1.33% ($n = 6$),表明仪器精密度良好。

重复性试验:取同一批(批号为20220110)样品适量,共6份,按2.1.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算含量。结果大戟二烯醇含量的RSD为1.29% ($n = 6$),表明方法重复性良好。

稳定性试验:分别取芫花、甘遂、大戟、大枣各3.00 g,精密称定,按2.1.2项下方法制备供试品溶液,分别于0, 2, 4, 6, 8, 12, 24 h时按2.1.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果峰面积的RSD为1.46% ($n = 7$),表明样品在24 h内稳定性良好。

加样回收试验:取已知含量的供试品溶液9份,分为低、中、高3组,各3份,分别加入相当于样品中大戟二烯醇含量50%, 100%, 150%的对照品溶液,按2.1.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,计算回收率。结果平均加样回收率为100.11%, RSD为1.84% ($n = 9$)。

2.1.4 含量测定

分别取芫花、甘遂、大戟、大枣各3.00 g,精密称定,平行3份,按2.1.2项下方法分别制备供试品溶液和对照品溶液,按2.1.1项下色谱条件进样测定,记录色谱图,按外标法以峰面积计算含量。结果3批样品中大戟二烯醇的含量分别为0.95, 0.98, 1.04 mg/g。

2.2 干膏得率测定

精密量取供试品溶液10 mL,置已干燥至恒重的洁净蒸发皿中,水浴蒸干,105 °C烘箱中干燥4 h后取出,放入干燥器冷却,称定质量,计算干膏得率。干膏得率(%) = 干膏质量 / 药材质量 × 100%。

2.3 单因素试验

查阅文献[17-18]并结合预试验,以提取时间(因素A)、加水量(因素B)和提取次数(因素C)为影响因素进行单因素试验,分别考察上述3种因素对大戟二烯醇含量和干膏得率综合评分的影响。综合评分 = $(X_1 / X_{\max} \times 0.8 + Y_1 / Y_{\max} \times 0.2) \times 100$ [17]。其中, X_1 为当次大戟二烯醇含量, X_{\max} 为大戟二烯醇含量最大值, Y_1 为当次干膏得率, Y_{\max} 为干膏得率最大值。详见表1。

提取时间[17]:当提取时间从0.5 h升至1.5 h时,综合评分逐渐升高;超过1.5 h后,随着时间的延长,综合评分逐渐下降(图2 A)。故选择1.0, 1.5, 2.0 h进行考察。

加水量:当加水量从8倍升至12倍时,综合评分逐

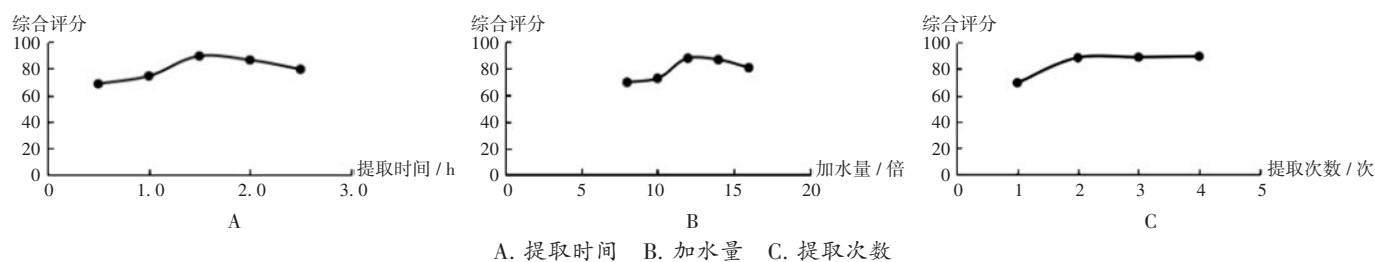


图2 单因素试验结果
A. Extraction time B. Water addition C. Extraction times

Fig. 2 Results of the single factor test

表1 单因素变化条件

Tab. 1 Conditions of the single factor test

因素	单因素变化条件	其他条件
提取时间	0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 h	加水量10倍, 提取1次
加水量	8, 10, 12, 14, 16倍	提取1次, 提取0.5 h
提取次数	1, 2, 3, 4次	加水量10倍, 提取0.5 h

渐升高;升至16倍时,综合评分下降(图2 B)。故选择10, 12, 14倍进行考察。

提取次数:提取2次时综合评分最高(图2 C),但考虑提取时间和溶剂用量,选择1, 2, 3次进行考察。

2.4 正交试验

根据单因素试验结果,采用 $L_9(3^4)$ 正交试验进行考察,因素与水平见表2。以大戟二烯醇含量及干膏得率的综合评分为评价指标,采用SPSS 16.0统计学软件对十枣汤的提取工艺进行分析。正交试验设计与结果见表3。由表4可知,3个因素对提取工艺的影响大小依次为 $C > A > B$;由表3可知,最佳提取工艺为 $C_2A_2B_1$ 。方差分析结果表明,因素A和因素C对结果均有显著影响($P < 0.05$),因素B对结果无显著影响($P > 0.05$),故优选的最佳提取工艺为提取2次,提取时间为1.5 h,加入10倍量水。

表2 因素与水平

Tab. 2 Factors and levels

水平	因素A(h)	因素B(倍)	因素C(次)
1	1.0	10	1
2	1.5	12	2
3	2.0	14	3

2.5 验证试验

按处方量称取芫花、甘遂、大戟、大枣,平行制备5份样品,按最佳提取工艺提取,测得大戟二烯醇的平均含量为0.99 mg/g, RSD为1.24% ($n = 5$);平均干膏得率为44.01%, RSD为1.64% ($n = 5$)。结果表明,该优选工艺合理,提取方法可行。

3 讨论

中药汤剂的质量直接影响其临床疗效,正交试验设计是目前应用广泛的优选提取工艺的方法,尤其是在进行工业大生产前,优良的提取工艺可节省大量的财力和

表3 正交试验设计与结果

Tab. 3 Design and results of the orthogonal test

试验号	因素				大戟二烯醇(mg/g)	干膏得率(%)	综合评分
	A	B	C	D(空白)			
1	1	1	1	1	0.68	36.25	60.78
2	1	2	2	2	0.82	40.12	71.72
3	1	3	3	3	0.77	38.21	67.58
4	2	1	2	3	1.03	40.52	97.68
5	2	2	3	1	0.83	40.35	72.48
6	2	3	1	2	0.76	36.52	66.19
7	3	1	3	2	0.82	45.83	74.21
8	3	2	1	3	0.61	35.21	55.70
9	3	3	2	1	0.98	36.87	80.88
K_1	66.70	73.60	60.90	71.39			
K_2	74.83	66.65	79.47	70.72			
K_3	70.28	71.56	71.44	69.70			
R	8.124	6.956	18.573	1.696			

表4 方差分析结果

Tab. 4 Results of the ANOVA

方差来源	离差平方和	自由度	均方	F值	P
因素A	99.46	2.00	49.73	22.72	< 0.05
因素B	76.69	2.00	38.35	17.52	> 0.05
因素C	520.61	2.00	260.31	118.94	< 0.05
误差	4.38	2.00	2.19		

注: $F_{0.05}(2, 2) = 19.00$ 。

Note: $F_{0.05}(2, 2) = 19.00$ 。

人力。我国从20世纪90年代就引入了煎药机,这种大批量生产汤剂的方式不仅节约时间,还能保证在最佳提取工艺条件下提取较高含量的有效成分。本研究中优选了提取次数、提取时间及加水量3个因素,并对其结论进行了验证,为十枣汤提取工艺参数的选择提供了科学依据。本研究中的待测成分为大戟二烯醇,来源于本方中的甘遂和大戟,是十枣汤治疗水肿胀满、胸腔积液、腹水、二便不利的主要活性成分。在实际测定中,由于大戟二烯醇的极性较小,采用高效液相色谱法测定时,出峰时间较长,流动相稍调整会导致出峰时间的大幅变动,同时考虑样品中其他成分的干扰,最终确定以乙腈-0.1%甲酸水溶液(90:10, V/V)为流动相进行分离。