

[11] Coxam V. Phyto-oestrogens and bone health: symposium on ‘Diet and bone health’ [J]. *Proc Nutr Soc*, 2008, 67(2): 184-195.

[12] Song W, Li Y J, Qiao X, *et al*. Chemistry of the Chinese herbal medicine *Puerariae Radix* (Ge-Gen): A review[J]. *J Chin Pharm Sci*, 2014, 23(6): 347-360.

[13] 国海东, 蒋 艳, 上官新晨, 等. 葛根素的稳定性研究[J]. *食品科技*, 2014, 39(11): 229-232.

[14] 李 玲, 全沁果, 沈艳欣, 等. 野葛藤地上部分葛根素的提取及稳定性研究[J]. *食品工业科技*, 2016, 37(9): 235-239.

[15] 高 远, 吕邵娃, 孙 爽, 等. 提高葛根素生物利用度的研究进展[J]. *中医药学报*, 2012, 40(6): 127-130.

[16] 吴正红, 朱延勤, 严汉英, 等. 葛根素的溶解性及高分子聚合物助溶作用的研究[J]. *江苏药学与临床研究*, 1999, 7(1): 9-11.

[17] 王 成, 刘玉玲, 谷士杰. 葛根素的溶解性及其络合剂助溶的研究[J]. *中国药学杂志*, 1993, 28(5): 294-296.

[18] 施跃锦. Fenton 反应的应用及其影响因素的研究[J]. *贵州化工*, 2009, 34(2): 30-34.

[19] 文 镜, 贺素华, 杨育颖, 等. 保健食品清除自由基作用的体外测定方法和原理[J]. *食品科学*, 2004, 25(11): 190-195.

[20] 韩少华, 朱靖博, 王妍妍. 邻苯三酚自氧化法测定抗氧化活性的方法研究[J]. *中国酿造*, 2009(6): 155-157.

[21] 高 远, 吕邵娃, 孙 爽, 等. 提高葛根素生物利用度的研究进展[J]. *中医药学报*, 2012, 40(6): 127-130.

[22] 陈 训, 段林东, 赵良忠. 葛根全原粉中葛根素的提取工艺研究[J]. *安徽农业科学*, 2014, 42(36): 13018-13020.

[23] 张 曦, 李雪峰, 戴宛蓉. 葛根提取物的抗氧化性研究[J]. *广东化工*, 2013, 40(21): 65-66, 78.

[24] Higuchi A, Shirano K, Harashima M, *et al*. Chemically modified polysulfone hollow fibers with vinylpyrrolidone having improved blood compatibility[J]. *Biomaterials*, 2002, 23(13): 2659-2666.

[25] Siebert K J, Lynn P Y. Comparison of polyphenol interactions with polyvinylpolypyrrolidone and haze-active protein[J]. *J Am Soc Brew Chem*, 1998, 56(1): 24-31.

[26] Tantishaiyakul V, Kaewnopparat N, Ingkatawornwong S. Properties of solid dispersions of piroxicam in polyvinylpyrrolidone [J]. *Int J Pharm*, 1999, 181(2): 143-151.

[27] Craig D Q. The mechanisms of drug release from solid dispersions in water-soluble polymers[J]. *Int J Pharm*, 2002, 231(2): 131-144.

苓甘五味姜辛汤水煎煮工艺的优化

韩燕全¹, 孙方方^{1,2#}, 冉 嫻^{1,2}, 宋 燕^{1,2}, 潘凌宇^{1,2}, 洪 燕^{2*}

(1. 安徽中医药大学第一附属医院, 国家中医药管理局中药制剂三级实验室, 安徽 合肥 230031; 2. 安徽中医药大学, 中药复方重点实验室, 安徽 合肥 230031)

摘要: **目的** 优化苓甘五味姜辛汤水煎煮工艺。 **方法** 以加水量、浸泡时间、煎煮时间、煎煮次数为影响因素, 总酚酸、甘草苷、甘草酸单铵盐、6-姜酚、五味子醇甲、细辛脂素含有量及浸膏得率为评价指标, 正交试验优化水煎煮工艺。 **结果** 最佳条件为加 12 倍量水浸泡 50 min 后煎煮 2 次, 每次 40 min, 总酚酸、甘草苷、甘草酸单铵盐、6-姜酚、五味子醇甲、细辛脂素含有量分别为 17.54、0.059 7、0.152 5、0.003 7、0.003 7、0.009 4 mg/g, 浸膏得率 16.10%, 综合评分 99.16。 **结论** 该方法稳定、简便、可靠, 可用于水煎煮苓甘五味姜辛汤。

关键词: 苓甘五味姜辛汤; 水煎煮工艺; 正交试验

中图分类号: R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2018)11-2436-05

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2018.11.015

收稿日期: 2018-07-09

基金项目: 国家中医药管理局临床中药学重点学科建设项目 (国中医药人教发 [2012] 32); 安徽省自然科学基金项目 (1708085MH196); 安徽省卫生计生委中医药科研课题 (2016zy03)

作者简介: 韩燕全 (1978—), 男, 副主任药师, 硕士生导师, 研究方向为中药炮制与质量控制。Tel: 13155194913, E-mail: hyquan2003@163.com

孙方方 (1991—), 女, 硕士生, 研究方向为中药炮制与质量控制。Tel: 18156992609, E-mail: 690229071@qq.com

* **通信作者:** 洪 燕 (1975—), 女, 副教授, 研究方向为中药药理学。E-mail: hyan2003@163.com

Optimization of water decoction process for Linggan Wuwei Jiangxin Decoction

HAN Yan-quan¹, SUN Fang-fang^{1,2#}, RAN Shan^{1,2}, SONG Yan^{1,2}, PAN Ling-yu^{1,2}, HONG Yan^{2*}
(1. State Administration of Traditional Chinese Medicine Tertiary Laboratory for TCM Preparations, the First Hospital Affiliated to Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230031, China; 2. Key Laboratory for Chinese Herbal Compound, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230031, China)

KEY WORDS: Linggan Wuwei Jiangxin Decoction; water decoction process; orthogonal test

苓甘五味姜辛汤始载于《金匱要略》，是临床治疗寒饮伏肺的经典方剂，为既祛饮邪又止咳平喘的良方，由干姜、细辛、茯苓、甘草、五味子组成，以干姜为君药，既温中散寒以化寒饮，又回阳通脉而化湿消痰；臣以细辛、茯苓，分别取其温肺化饮、健脾渗湿之功效，助干姜温肺散凝聚之寒饮、健脾阳以绝痰饮之源；佐以味酸性敛的五味子，既收敛肺气以止咳，又防干姜、细辛辛散太过而伤肺气；蜜甘草为使，和中而调和诸药，全方药材虽仅 5 味，但组成严谨，配伍精当，诸药合用共奏温肺化饮之功效^[1-3]。

汤剂是中药煎煮或浸泡后去渣取汁制成的液体制剂，是临床应用最早、范围最广的中药剂型，具有制备简单、易吸收等优点，但也有易受煎煮时间、煎煮次数等条件影响导致其疗效不稳定的不足^[4]。苓甘五味姜辛汤临床应用历史悠久，但鲜有其水煎煮工艺的研究报道，课题组前期通过预试验，确定方中总酚酸、甘草苷、甘草酸单铵盐、6-姜酚，细辛脂素、五味子醇甲 5 个指标成分的含有量较高，故本实验以其和浸膏得率为评价指标，优化该方水煎煮工艺，以使其临床用药更具有实际意义。

1 材料

1.1 仪器 Agilent 8453 紫外可见分光光度计（美国 Agilent 公司）；BP211D 电子天平（德国 Sartorius 公司）；KQ3200D 超声波清洗机（昆山市超声仪器有限公司）；真空干燥箱（上海博讯实业有限公司）；Waters Acquity UPLC 色谱仪（配置自动进样器、二极管阵列检测器、四元梯度泵柱温箱、Empower2 工作站，美国 Waters 公司）。

1.2 试药 茯苓、甘草、干姜、细辛、五味子购自亳州中药饮片厂，经安徽中医药大学第一附属医院韩燕全副主任中药师鉴定为正品，符合 2015 版《中国药典》规定。6-姜酚（DST161210-027）、甘草苷（DST160910-009）、五味子醇甲（DST161117-010）、细辛脂素（DST170425-014）对照品均购自成都德思特生物技术有限公司；甘草酸单铵盐

（PS0061-0020）对照品购自成都普思生物科技股份有限公司。乙腈为色谱纯；甲醇、磷酸等为分析纯；水为蒸馏水〔屈臣氏集团（香港）有限公司〕。

2 方法与结果

2.1 正交试验 根据《金匱要略》处方组成，称取茯苓 12 g、甘草 9 g、干姜 9 g、细辛 5 g、五味子 5 g，一起放到砂锅中进行煎煮，以加水量（A）、浸泡时间（B）、煎煮时间（C）、煎煮次数（D）为影响因素，设计 4 因素 3 水平正交试验。因素水平见表 1。

表 1 因素水平
Tab. 1 Factors and levels

水平	因素			
	A 加水量/ 倍	B 浸泡时间/ min	C 煎煮时间/ min	D 煎煮次数/ 次
1	8	30	30	1
2	10	40	40	2
3	12	50	50	3

2.2 浸膏得率测定 取表 1 因素水平所得的 9 份提取液，过滤，滤液浓缩至 100 mL，取 50 mL 置于已恒重的蒸发皿中（质量为 M_1 ），水浴蒸干溶剂，于 105 ℃烘箱中干燥 3 h 后取出，移到干燥器中冷却至室温，称定质量，在相同条件下继续干燥 1 h，冷却，称定质量，直至连续 2 次的质量差不超过 5 mg 为止，记录此时的质量（ M_2 ），计算浸膏得率，公式为得率 = $[(M_2 - M_1) / \text{原药材质量}] \times 100\%$ 。

2.3 总酚酸含有量测定（紫外分光光度法）^[5-8]

2.3.1 供试品溶液制备 取“2.2”项下 9 份干浸膏，每份 0.2 g，75% 甲醇溶解，超声（250 W、40 Hz）30 min，制得 9 组 2 mg/mL 供试品溶液（ $S_1 \sim S_9$ ）。

2.3.2 对照品溶液制备 甲醇溶解适量 6-姜烯酚对照品粉末，制成 0.8 mg/mL 溶液，即得。

2.3.3 线性关系考察 取对照品溶液 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL，置于 10 mL 量瓶中，甲醇定容

至刻度。以甲醇为空白对照，紫外分光光度法测定 280 nm 波长处的吸光度，以其为纵坐标 (A)，对照品溶液质量浓度为横坐标 (X) 进行回归，得回归方程为 $A = 7.915\ 6X - 0.007\ 4$ ($r = 0.999\ 5$)，在 0.016 ~ 0.08 mg/mL 范围内线性关系良好。

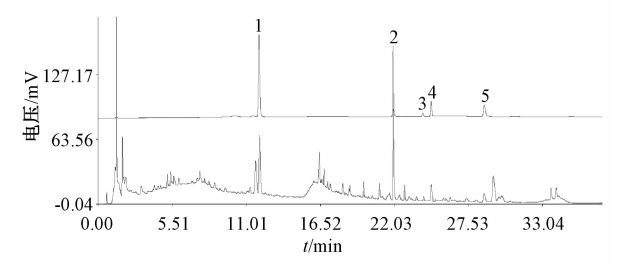
2.3.4 稳定性试验 取“2.3.1”项下供试品溶液 (S_1)，于 20、40、60、80、100、120 min 按“2.3.3”项下方法测定吸光度，测得其 RSD 为 0.53%，表明供试品溶液在 120 min 内稳定性良好。

2.3.5 精密度试验 取“2.3.2”项下对照品溶液，按“2.3.3”项下方法测定吸光度 6 次，测得其 RSD 为 0.29%，表明仪器精密度良好。

2.3.6 重复性试验 取“2.3.1”项下供试品溶液 (S_1) 6 份，按“2.3.3”项下方法测定吸光度，测得其 RSD 为 0.39%，表明该方法重复性良好。

2.4 甘草苷、甘草酸单铵盐、6-姜酚、五味子醇甲、细辛脂素含有量测定 (UPLC 法)^[9-10]

2.4.1 色谱条件 Waters Acquity BEH C_{18} 色谱柱 (2.1 mm × 100 mm, 1.6 μ m)；流动相乙腈 (A) - 0.1% 磷酸 (B)，梯度洗脱 (0 ~ 5 min, 5% A；5 ~ 6 min, 18% A；6 ~ 12.5 min, 18% ~ 23% A；12.5 ~ 13.5 min, 23% ~ 30% A；13.5 ~ 20.5 min, 30% ~ 45% A；20.5 ~ 23 min, 45% ~ 55% A；23 ~ 30 min, 55% A；30 ~ 32 min, 55% ~ 100% A；32 ~ 33 min, 100% ~ 5% A；33 ~ 37 min, 5% A)；检测波长 240 nm；体积流量 0.2 mL/min；柱温室温。色谱图见图 1。



注：由上至下，依次为对照品、供试品

1. 甘草苷 2. 甘草酸单铵盐 3. 6-姜酚 4. 细辛脂素

5. 五味子醇甲

1. liquiritin 2. glycyrrhizic acid ammonium salt 3. 6-gingerol

4. asarinin 5. schisandrin

图 1 各成分 UPLC 色谱图

Fig. 1 UPLC chromatograms of various constituents

2.4.2 供试品溶液制备 同“2.3.1”项。

2.4.3 对照品溶液制备 精密称取甘草苷、甘草

酸单铵盐、6-姜酚、五味子醇甲、细辛脂素适量，甲醇溶解，制成质量浓度分别为 0.049 0、0.058 1、0.001 8、0.002 3、0.009 8 mg/mL 的溶液，即得。

2.4.4 线性关系考察 取“2.4.3”项下对照品溶液，在“2.4.1”项色谱条件下进样 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 μ L 测定。以进样量为横坐标 (X)，峰面积为纵坐标 (Y) 进行回归，结果见表 2，可知各成分在各自范围内线性关系良好。

表 2 各成分线性关系

Tab. 2 Linear relationships of various constituents

成分	回归方程	线性范围/ (μ g·mL ⁻¹)	r
甘草苷	$Y = 735\ 560X - 164\ 750$	49.0 ~ 245.0	0.999 9
甘草酸单铵盐	$Y = 373\ 167X - 78\ 378$	58.1 ~ 290.5	0.999 6
6-姜酚	$Y = 24\ 869X - 7\ 143.4$	1.8 ~ 9.2	0.999 7
五味子醇甲	$Y = 10\ 179X + 212.58$	2.3 ~ 11.5	0.999 9
细辛脂素	$Y = 127\ 447X - 29\ 310$	9.8 ~ 49.0	0.999 6

2.4.5 精密度试验 取“2.4.3”项下对照品溶液，在“2.4.1”项色谱条件下进样测定 6 次，测得甘草苷、甘草酸单铵盐、6-姜酚、五味子醇甲、细辛脂素峰面积 RSD 分别为 0.48%、0.32%、1.34%、1.08%、2.67%，表明仪器精密度良好。

2.4.6 重复性试验 取“2.4.2”项下供试品溶液 (S_1) 6 份，在“2.4.1”项色谱条件下进样测定，测得甘草苷、甘草酸单铵盐、6-姜酚、五味子醇甲、细辛脂素峰面积 RSD 分别为 0.36%、1.23%、1.80%、0.62%、3.53%，表明该方法重复性良好。

2.4.7 稳定性试验 取“2.4.2”项下供试品溶液 (S_1)，于 4、8、12、16、20、24 h 在“2.4.1”项色谱条件下进样测定，测得甘草苷、甘草酸单铵盐、6-姜酚、五味子醇甲、细辛脂素峰面积 RSD 分别为 0.59%、0.33%、1.78%、1.70%、0.61%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.5 综合加权法分析^[11-15] 总分设置为 100 分；甘草苷 (W_1)、甘草酸单铵盐 (W_2)、6-姜酚 (W_3)、五味子醇甲 (W_4)、细辛脂素 (W_5) 含有量权重系数均设置为 10 分；由于浸膏得率具有整体代表性，故将其设置为 30 分；总酚酸含有量设置为 20 分，综合评分 = 10.0 × 甘草苷含有量/最大值 + 10.0 × 甘草酸单铵盐含有量/最大值 + 10.0 × 6-姜酚含有量/最大值 + 10.0 × 五味子醇甲/最大值 + 10.0 × 细辛脂素含有量/最大值 + 20.0 × 总酚酸含有量/最大值 + 30.0 × 浸膏得率/最大值。结果见表 3，方差分析见表 4。

表 3 试验设计及结果 ($n=2$)
Tab.3 Design and results of tests ($n=2$)

试验号	A	B	C	D	浸膏得率/ %	总酚酸/ (mg·g ⁻¹)	甘草苷/ (mg·g ⁻¹)	甘草酸单铵 盐/(mg·g ⁻¹)	6-姜酚/ (mg·g ⁻¹)	五味子醇甲/ (mg·g ⁻¹)	细辛脂素/ (mg·g ⁻¹)
1	1	1	1	1	9.500	4.60	0.040 5	0.086 0	0.002 5	0.002 7	0.007 7
2	1	2	2	2	15.000	6.64	0.039 5	0.083 7	0.002 8	0.003 3	0.012 1
3	1	3	3	3	15.500	8.08	0.056 3	0.112 6	0.002 0	0.003 7	0.007 9
4	2	1	2	3	16.000	6.92	0.046 9	0.107 1	0.002 6	0.003 2	0.009 3
5	2	2	3	1	10.500	8.52	0.046 3	0.113 9	0.002 4	0.002 8	0.007 0
6	2	3	1	2	13.500	9.84	0.060 1	0.151 1	0.002 9	0.003 3	0.006 6
7	3	1	3	2	15.250	7.10	0.032 8	0.083 8	0.008 9	0.003 2	0.007 7
8	3	2	1	3	15.250	8.32	0.057 8	0.153 7	0.002 8	0.003 8	0.008 3
9	3	3	2	1	10.675	13.78	0.058 9	0.155 2	0.008 2	0.002 6	0.012 4
K_1	66.876	67.386	70.129	64.955							
K_2	71.228	71.669	74.708	74.546							
K_3	78.125	77.174	71.391	76.728							
R	11.249	9.788	4.579	11.773							

表 4 方差分析
Tab.4 Analysis of variance

因素	离均差平方和	自由度	F 比	F 临界值
A	193.036	2	0.820	19.000
B	144.455	2	0.614	19.000
C	33.566	2	0.143	19.000
D	235.371	2	1.000	19.000
误差	235.370	2	—	—

由表 3 可知,各因素影响程度依次为 D>A>B>C,即提取次数>加水量>浸泡时间>煎煮时间;由表 4 可知,提取次数对结果影响最大,但差异无统计学意义($P>0.05$)。因此,根据实际情况及操作简便原则,确定最优工艺为 A₃B₃C₂D₂,

即加 12 倍量水浸泡 50 min 后煎煮 2 次,每次 40 min。

2.6 验证试验 根据优化工艺进行 3 批验证试验,结果见表 5,可知该工艺稳定可行。

表 5 验证试验结果 ($n=3$)
Tab.5 Results of verification tests ($n=3$)

试验号	浸膏得率/%	总酚酸/ (mg·g ⁻¹)	甘草苷/ (mg·g ⁻¹)	甘草酸单铵盐/ (mg·g ⁻¹)	6-姜酚/ (mg·g ⁻¹)	五味子醇甲/ (mg·g ⁻¹)	细辛脂素/ (mg·g ⁻¹)	综合评分
1	16.10	17.46	0.060 2	0.151 2	0.003 7	0.003 5	0.009 5	98.99
2	16.15	17.78	0.059 4	0.153 2	0.003 6	0.003 8	0.009 4	99.60
3	16.06	17.38	0.059 4	0.153 1	0.003 7	0.003 7	0.009 4	98.88
平均值	16.10	17.54	0.059 7	0.152 5	0.003 7	0.003 7	0.009 4	99.16

3 讨论

UPLC 法具有分析时间快、灵敏度高、重复性好等特点,本实验考察了柱长、柱径、柱温、体积流量、流动相等参数,最终确定“2.4.1”项下色谱条件,此时色谱峰间隔良好,基线稳定,有利于对特征成分的分析。

茯苓、甘草、干姜、细辛、五味子均含有酚酸

类成分,故将总酚酸含有量作为评价指标;2015 版《中国药典》中甘草苷、6-姜酚、细辛脂素、五味子醇甲分别作为甘草、干姜、细辛、五味子含有量测定指标成分,并且甘草中甘草酸单铵盐含有量很高,故也将以上成分作为评价指标;茯苓由于其所含成分少,含有量低,故不予考虑;浸膏得率对药材中有效成分的提取情况具有总体代表性。综

上所述,本实验选择总酚酸、甘草苷、甘草酸单铵盐、6-姜酚、五味子醇甲、细辛脂素含有量及浸膏得率作为评价指标。

汤剂在我国已有上千年的应用历史,是一种符合中医辨证论治思想的剂型,可根据具体病症情况加减药味,具有很大的用药灵活性,其药效发挥与煎煮过程有着密不可分的关系。本实验通过正交试验优化苓甘五味姜辛汤水煎煮工艺,可为该方临床应用提供实验依据。

参考文献:

[1] 李 岩,李荣科,朱向东. 苓甘五味姜辛汤近 5 年研究进展[J]. 新中医,2015,47(10): 212-213.

[2] 姚鹏宇,张国凯,刘 伟,等. 苓甘五味姜辛汤系列方的临床证治研究[C] //中华中医药学会第十四次中医方剂学学术年会论文集. 北京:中华中医药学会,2014.

[3] 梁蔚莉.《金匱要略》苓甘五味姜辛汤治疗寒饮型成人支原体肺炎疗效观察[J]. 中国现代医生,2013,51(22): 99-100,103.

[4] 冯文杰,贾晓斌,刘 丹. 影响煎煮汤剂质量的多因素分析及规范化管理研究[J]. 中草药,2014,45(16): 2422-2426.

[5] 赵小燕,李 波,杨正明,等. 坚杆火绒草中总酚酸的提取及含量测定[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(9): 19-21.

[6] 田 静,夏玉凤,房克慧. HPLC 法同时测定苍耳类药材中 8 种酚酸类成分的含量[J]. 中药材,2013,36(10): 1623-1626.

[7] 王坤凤,林 琛,吴玲芳,等. 不同产地叶下珠药材中总酚含量测定[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(13): 110-112.

[8] 李 娟,麻晓雪,李顺祥,等. 铁皮石斛中总酚的含量测定[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(24): 60-62.

[9] 张友波,徐 崑,杨秀伟,等. RP-HPLC 法同时测定不同产地甘草中 9 个主要成分的含量[J]. 药物分析杂志,2013,33(2): 214-219,229.

[10] 叶日贵,高 杰,王 冰,等. 超高效液相-串联四极杆质谱联用法同时测定并比较甘草各部位中 8 种成分含量[J]. 食品科学,2014,35(20): 242-247.

[11] 刘香南,李明珠,尚晓娜,等. “一测多评”法测定甘草中 6 种有效成分含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(24): 56-59.

[12] 冯 果,刘 文,张永萍,等. 结合药效学指标正交优选复方止呕颗粒提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(18): 32-34.

[13] 胡斌杰,韩艳霞,姬 红. 正交实验法超声提取灵芝多糖最佳工艺研究[J]. 中药材,2008,31(1): 142-143.

[14] 耿魁魁,刘 圣,吴 妍. 正交实验法优选注射用丹参多酚酸盐调配技术[J]. 中成药,2015,37(1): 220-222.

[15] 李钰馨,韩燕全,洪 燕,等. 多指标正交试验优选炮苍耳子中酚酸类成分的提取工艺[J]. 安徽中医药大学学报,2015,34(4): 82-85.