

- [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 polyvinylpyrrolidone 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#}, 冉姗^{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、0.0597、0.1525、0.0037、0.0037、0.0094 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《金匮要略》，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 超声波清洗仪（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《金匮要略》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 = $\left[\frac{(M_2 - M_1)}{M_1} \right] \times 100\%$ 。

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 $A = 7.915 \times 10^{-4}X - 0.0074$ ($r = 0.9995$),在0.016~0.08 mg/mL范围内线性关系良好。

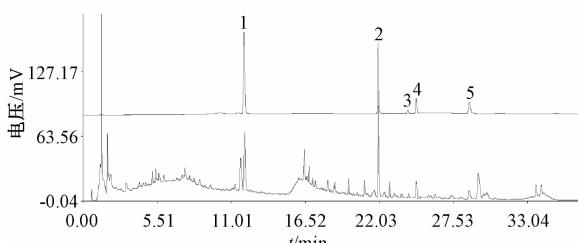
2.3.4 稳定性试验 取“2.3.1”项下供试品溶液(S_1),于20、40、60、80、100、120 min按“2.3.3”项下方法测定吸光度,测得其RSD为0.53%,表明供试品溶液在120 min内稳定性良好。

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 C₁₈色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.6 μm);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 μL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/ (μg·mL ⁻¹)	r
甘草苷	$Y = 735.560X - 164.750$	49.0~245.0	0.9999
甘草酸单铵盐	$Y = 373.167X - 78.378$	58.1~290.5	0.9996
6-姜酚	$Y = 24.869X - 7.143.4$	1.8~9.2	0.9997
五味子醇甲	$Y = 10.179X + 212.58$	2.3~11.5	0.9999
细辛脂素	$Y = 127.447X - 29.310$	9.8~49.0	0.9996

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	0.0405	0.0860	0.0025	0.0027	0.0077
2	1	2	2	2	15.000	6.64	0.0395	0.0837	0.0028	0.0033	0.0121
3	1	3	3	3	15.500	8.08	0.0563	0.1126	0.0020	0.0037	0.0079
4	2	1	2	3	16.000	6.92	0.0469	0.1071	0.0026	0.0032	0.0093
5	2	2	3	1	10.500	8.52	0.0463	0.1139	0.0024	0.0028	0.0070
6	2	3	1	2	13.500	9.84	0.0601	0.1511	0.0029	0.0033	0.0066
7	3	1	3	2	15.250	7.10	0.0328	0.0838	0.0089	0.0032	0.0077
8	3	2	1	3	15.250	8.32	0.0578	0.1537	0.0028	0.0038	0.0083
9	3	3	2	1	10.675	13.78	0.0589	0.1552	0.0082	0.0026	0.0124
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 $A_3B_3C_2D_2$,

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	0.0602	0.1512	0.0037	0.0035	0.0095	98.99
2	16.15	17.78	0.0594	0.1532	0.0036	0.0038	0.0094	99.60
3	16.06	17.38	0.0594	0.1531	0.0037	0.0037	0.0094	98.88
平均值	16.10	17.54	0.0597	0.1525	0.0037	0.0037	0.0094	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

茯苓、甘草、干姜、细辛、五味子均含有酚酸

上述,本实验选择总酚酸、甘草昔、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芩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.芩甘五味姜辛汤近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.芩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药学术年会论文集.北京:中华中医药学会,2014.
- [3] 梁蔚莉.《金匮要略》芩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,徐嵬,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.