

# 正交试验优选四逆汤机械煎煮工艺

刘晓<sup>1,2</sup>, 范林乾<sup>1,2</sup>, 蔡皓<sup>1,2</sup>, 周其冈<sup>3</sup>, 蔡宝昌<sup>2,4\*</sup>

- (1. 南京中医药大学药学院, 南京 210046;  
2. 南京中医药大学江苏省中药炮制重点实验室, 南京 210029;  
3. 南京医科大学药学院, 南京 210029; 4. 南京海昌中药集团有限公司, 南京 210061)

**[摘要]** 目的: 优化四逆汤机械煎煮工艺。方法: 以苯甲酰新乌头原碱、甘草苷、甘草酸和 6-姜酚的含量为考核指标, 采用 RP-HPLC 法测定指标成分含量, 通过单因素试验和正交设计考察加水量、浸泡时间、煎煮时间及煎煮次数等影响因素, 优选四逆汤机械煎煮工艺。结果: 四逆汤最佳机械煎煮工艺为浸泡时间 60 min, 煎煮时间 60 min, 加水量 10 倍, 煎煮 2 次。结论: 优化的煎煮工艺合理可行, 为提高四逆汤剂质量与临床疗效提供实验基础。

**[关键词]** 四逆汤; 机械煎煮工艺; 正交设计; 苯甲酰新乌头原碱; 甘草苷; 甘草酸; 6-姜酚

**[中图分类号]** R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)20-0024-04

## Optimization of Mechanical Boiling Technology for Sini Decoction by Orthogonal Test

LIU Xiao<sup>1,2</sup>, FAN Lin-qian<sup>1,2</sup>, CAI Hao<sup>1,2</sup>, ZHOU Qi-gang<sup>3</sup>, CAI Bao-chang<sup>2,4\*</sup>

- (1. College of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China;  
2. Jiangsu Key Laboratory of Chinese Medicine Processing, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China; 3. Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China;  
4. Nanjing Haichang Chinese Medicine Group Co. Ltd, Nanjing 210061, China)

**[Abstract]** **Objective:** To optimize mechanical boiling technology of Sini decoction. **Method:** With the contents of benzoylmesaconine, liquiritin, glycyrrhizic acid and 6-gingerol as indexes, the content of indicator ingredients were determined by HPLC, mechanical boiling technology of Sini decoction was optimized by single factor test and orthogonal test with the amount of water, soaking time, boiling time and boiling times as factors. **Result:** Optimum mechanical boiling technology was as follows: soaked 60 min with 10 times the amount of water, boiled 2 times with 60 min per time. **Conclusion:** This optimized technology was rational and feasible, it could provide experimental basis for improving quality and clinical efficacy of Sini decoction.

**[Key words]** Sini decoction; mechanical boiling technology; orthogonal design; benzoylmesaconine; liquiritin; glycyrrhizic acid and 6-gingerol

**[收稿日期]** 20120529(011)

**[基金项目]** 国家中医药管理局中医药行业科研专项 (201007010)

**[第一作者]** 刘晓, 博士, 助理研究员, 从事中药质量控制与药剂临床煎煮规范化研究, Tel: 025-86798281, E-mail: liuxiao04\_0@163.com

**[通讯作者]** \* 蔡宝昌, 博士, 教授, 博士生导师, 从事中药炮制与药效物质基础研究, Tel: 025-86798281, E-mail: bccai@126.com

四逆汤是《伤寒论》中经典名方, 由生附子、干姜及炙甘草(蜜炙)组成, 具有温中祛寒、回阳救逆的功效<sup>[1-2]</sup>。现代药理研究表明该方具有强心、抗休克、增加冠脉血流量的作用, 是临床上常用的抗休克中药方剂之一<sup>[3-5]</sup>。现代研究包括《中国药典》2010年版(一部)所收载四逆汤含量测定项下, 多针对甘草中指标性成分含量进行考察<sup>[6-8]</sup>, 故本课题组前期利用 HPLC 建立与完善了可同时检测汤剂中苯甲酰新乌头原碱、甘草苷、甘草酸和 6-姜酚 4 种成

分的质量控制方法<sup>[9]</sup>。随着现代社会生活节奏的加快,机械煎煮使用频率不断增加,“代煎”现象在复方汤剂的临床应用中大量涌现。本文以汤剂中苯甲酰新乌头原碱、甘草苷、甘草酸和6-姜酚4种成分含量为指标,通过单因素试验考察浸泡时间、煎煮时间、加水量、煎煮次数,同时设计 $L_9(3^4)$ 正交表进行四逆汤机械煎煮工艺优化试验,为有效控制汤剂质量、保证临床疗效提供实验基础。

## 1 材料

1100型高效液相色谱仪(美国安捷伦公司),AG285型电子分析天平(瑞士Mettler Toledo公司),DHG-9240A型电热恒温鼓风干燥箱(上海精宏实验设备有限公司),TGL-16B离心机(上海安亭科学仪器厂),EPED-10TF型超纯水机(南京易普易达科技发展有限公司),YJX20/1+1型一体煎药机(北京东华原)。

苯甲酰新乌头原碱对照品(成都瑞芬斯生物科技有限公司,批号RFS-B-10-07-13),甘草苷、甘草酸铵、6-姜酚对照品均购于上海施丹德生物技术有限公司(批号分别为1321,1298,1263)。附子、炙甘草、干姜等药材均由南京海昌中药集团有限公司提供(批号分别为110217,110304,110224),经检验均符合《中国药典》2010年版(一部)相关项下要求;四氢呋喃、甲醇均为色谱纯,水为自制超纯水,其余试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 含量测定

**2.1.1 供试品溶液的制备** 精密称取炙甘草6.0 g、干姜9.0 g、附子15.0 g,煎煮制成每mL含生药量0.125 g的汤剂<sup>[10]</sup>。精密吸取汤剂样品8 mL,离心(4 000  $r \cdot \text{min}^{-1}$ ,10 min),精密量取上清液2 mL,用甲醇定容至5 mL,充分混匀,0.45  $\mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤,备用。

**2.1.2 对照品溶液的配制** 分别精密称取苯甲酰新乌头原碱、甘草苷、甘草酸和6-姜酚对照品适量,用甲醇配制成苯甲酰新乌头原碱、甘草苷、甘草酸和6-姜酚质量浓度分别为120,420,240,360  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的混合对照品储备液,备用。

**2.1.3 色谱条件** Thermo Hypersil BDS 色谱柱(4.6 mm  $\times$  250 mm,5  $\mu\text{m}$ ),流动相乙腈-四氢呋喃(25:15,A)和0.1  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 醋酸铵水溶液(每1 000 mL含 $\text{H}_3\text{PO}_4$  0.5 mL,B)梯度洗脱(0~48 min,15%~26% A;48~49 min,26%~35% A;49~65 min,35% A),流速1  $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ,检测波长235 nm,

柱温25  $^{\circ}\text{C}$ 。

**2.1.4 标准曲线的制备** 取含有苯甲酰新乌头原碱、甘草苷、甘草酸和6-姜酚的混合对照品储备液,用甲醇稀释成系列对照品溶液。进样10  $\mu\text{L}$ ,测定各色谱峰面积,以对照品质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标进行线性回归,结果见表1。

表1 四逆汤中4种指标成分的线性关系

成分	回归方程	线性范围 / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	$r$
苯甲酰新乌头原碱	$Y = 1\ 063X + 1.30$	6~120	0.999 9
甘草苷	$Y = 18\ 936 X + 18.9$	21~420	0.999 7
甘草酸	$Y = 3\ 871X - 9.18$	12~240	0.999 6
6-姜酚	$Y = 843X + 4.76$	18~360	0.999 5

### 2.2 单因素试验

**2.2.1 浸泡时间的影响** 按处方量称取四逆汤中各药材,在加水20倍量煎煮2次,每次60 min的条件下,分别考察浸泡0,20,30,60,90,120 min对各成分煎出率的影响,结果见图1。说明在0~90 min,随浸泡时间增加,各成分的煎出率升高,随后降低。故正交设计中浸泡时间水平定为30,60,90 min。

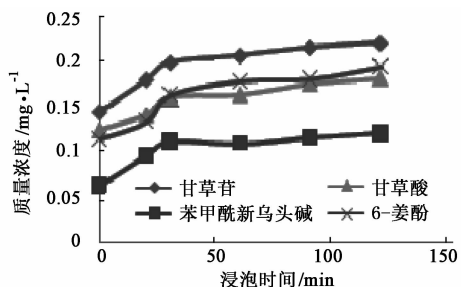


图1 浸泡时间对四逆汤中指标成分提取效率的影响

**2.2.2 煎煮时间的影响** 按处方量称取四逆汤中各药材,在确定加20倍量水浸泡30 min,煎煮2次的条件下,分别考察煎煮20,40,60,90,120 min对各成分煎出率的影响,结果见图2。说明煎煮时间超过60 min后,随煎煮时间增加,各成分煎出率降低,故正交设计中煎煮时间水平定为20,40,60 min。

**2.2.3 加水倍量的影响** 按处方量称取四逆汤中各药材,在确定浸泡时间30 min,煎煮时间30 min,煎煮2次的条件下,分别考察加5,10,15,20,25倍量水对各成分煎出率的影响,结果见图3。说明当加水倍量在5~20倍时,随加水量的增加,各成分煎出率增加,之后增加水量无明显变化。故正交设计中加水水平定为10,15,20倍。

**2.2.4 煎煮次数的影响** 按处方量称取四逆汤中

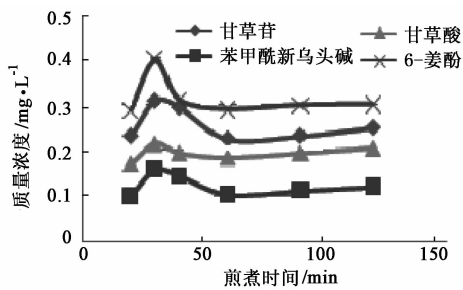


图 2 煎煮时间对四逆汤中指标成分提取效率的影响

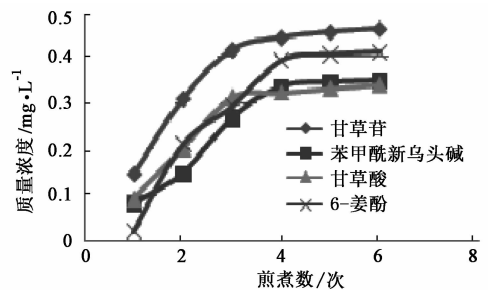


图 4 煎煮次数对四逆汤中指标成分提取效率的影响

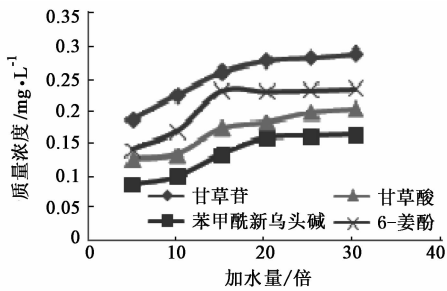


图 3 加水倍量对四逆汤中指标成分提取效率的影响

各药材,在确定浸泡时间 30 min,加 20 倍量水,煎煮时间 30 min 的条件下,分别考察煎煮 1,2,3,4,5,6 次对各成分煎出率的影响,结果见图 4。说明煎煮次数 > 3 次时,各成分煎出率几乎不再增加。故把正交设计中煎煮次数考察水平定为 1,2,3 次。

2.3 正交试验设计 在单因素试验基础上,考察浸泡时间、煎煮时间、加水倍量、煎煮次数对各成分煎出率的影响,因素水平见表 2。按处方量称取四逆汤中各药材,按  $L_9(3^4)$  正交表进行试验,优选其机械煎煮工艺,正交试验安排及结果见表 3,方差分析见表 4~7。

表 2 四逆汤机械煎煮工艺优选正交试验因素水平

水平	A 浸泡时间/min	B 煎煮时间/min	C 加水量/倍	D 煎煮数/次
1	30	20	10	1
2	60	40	15	2
3	90	60	20	3

表 3 四逆汤机械煎煮工艺优选正交试验安排

No.	A	B	C	D	甘草苷	苯甲酰新 乌头原碱	甘草酸	6-姜酚
1	1	1	1	1	2.108	0.104	1.500	0.371
2	1	2	2	2	9.752	1.368	6.572	3.816
3	1	3	3	3	12.38	2.950	7.528	7.160
4	2	1	2	3	8.304	1.177	4.060	3.960
5	2	2	3	1	6.288	1.056	3.872	1.898
6	2	3	1	2	15.01	3.587	13.00	8.861
7	3	1	3	2	6.908	1.920	8.344	5.562
8	3	2	1	3	8.944	1.458	7.732	2.826
9	3	3	2	1	4.088	0.312	1.912	0.541
甘草苷	$K_1$	24.24	17.32	26.06	12.48			
	$K_2$	29.60	24.98	22.14	31.67			
	$K_3$	19.94	31.47	25.57	29.62			
	R	9.66	14.15	3.918	19.18			
苯甲酰新乌头原碱	$K_1$	4.420	3.201	5.149	1.472			
	$K_2$	5.820	3.882	2.857	6.875			
	$K_3$	3.690	6.849	5.926	5.585			
	R	2.130	3.648	3.069	5.403			
甘草酸	$K_1$	15.60	13.90	22.23	7.284			
	$K_2$	20.93	18.17	12.54	27.916			
	$K_3$	17.98	22.44	19.74	19.32			
	R	5.332	8.534	9.690	20.63			
6-姜酚	$K_1$	11.34	9.892	12.05	2.809			
	$K_2$	14.71	8.540	8.317	18.23			
	$K_3$	8.929	16.56	14.62	13.94			
	R	5.789	8.022	6.302	15.42			

表4 甘草苷方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
A	15.621	2	7.810	5.137	>0.05
B	33.484	2	16.742	11.012	>0.05
C(误差)	3.040	2	1.520		
D	74.021	2	37.010	24.344	<0.05

注: $F_{0.05}(2,2) = 19.00$ (表5~7同)。

表5 苯甲酰新乌头原碱方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
A(误差)	0.780	2	0.390		
B	2.508	2	1.254	3.212	>0.05
C	1.697	2	0.848	2.173	>0.05
D	5.308	2	2.654	6.798	>0.05

表6 甘草酸方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
A(误差)	4.755	2	2.377		
B	12.143	2	6.071	2.553	>0.05
C	16.876	2	8.438	3.548	>0.05
D	71.604	2	35.802	15.056	>0.05

表7 6-姜酚方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
A(误差)	5.637	2	2.818		
B	12.296	2	6.148	2.181	>0.05
C	6.697	2	3.348	1.188	>0.05
D	42.277	2	21.138	7.499	>0.05

由表4可知,因素D为影响甘草苷煎煮的最主要影响因素,因素A,B对甘草苷的煎出无明显影响,最佳工艺为 $A_2B_3C_1D_2$ 。由表5可知,因素B,C,D对苯甲酰新乌头原碱的煎出均无明显影响,工艺为 $A_2B_3C_1D_2$ 时苯甲酰新乌头原碱含量最高。由表6可知,因素B,C,D对甘草酸的煎出均无明显影响,最佳工艺为 $A_2B_3C_1D_2$ 。由表7可知,因素B,C,D对6-姜酚的煎出均无明显影响,最佳工艺为 $A_2B_3C_1D_2$ 。综和各项指标,最终确定最佳提取工艺为 $A_2B_3C_1D_2$ ,即浸泡时间60 min,煎煮时间60 min,加水

量10倍,煎煮2次。

2.4 验证试验 称取处方量药材,按优选工艺进行3次验证试验,结果各成分的提取率分别为甘草苷13.37,15.60,15.21  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ;苯甲酰新乌头原碱3.22,4.31,3.36  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ;甘草酸14.24,12.39,12.84  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ;6-姜酚9.69,8.03,9.57  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

### 3 讨论

本试验通过单因素试验分别考察浸泡时间、煎煮时间、加水倍量、煎煮次数考察煎药机对四逆汤中4种有效成分煎出率的影响,对甘草苷煎出影响最显著的因素是煎煮次数;各因素对甘草酸、6-姜酚、苯甲酰新乌头原碱煎出率均无显著性影响。

### [参考文献]

- [1] 熊曼琪. 伤寒论[M]. 北京:人民卫生出版社, 2000:785.
- [2] 季宇彬. 中药复方化学与药理[M]. 北京:人民卫生出版社, 2003:2321.
- [3] 党万太,苗维纳,杨晓放,等. 基于钙调磷酸酶-活化T细胞核因子3信号转导通路探究四逆汤治疗心力衰竭的分子机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(22):201.
- [4] 范林乾,刘晓,蔡皓,等. 四逆汤对小鼠常压耐氧和冰水游泳的影响[J]. 南京中医药大学学报:自然科学版, 2012, 28(1):80.
- [5] 陶江. 四逆汤应用举隅[J]. 中国现代药物应用, 2011, 19(5):84.
- [6] 中国药典. 一部[S]. 2010:650.
- [7] 王晓莉,巩丽丽,容蓉,等. 3种方法制备的四逆汤中甘草苷、甘草酸含量测定[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(6):71.
- [8] 杨玉琴,梁光义,秦利芬,等. 不同制法四逆汤中甘草苷含量比较[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(24):40.
- [9] 刘晓,范林乾,蔡皓,等. HPLC同时测定四逆汤中4种指标性成分的含量[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(6):803.
- [10] 陈德兴,朱忠宝. 方剂学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2007:82.

[责任编辑 仝燕]