

正交试验法优化炙甘草汤煎煮方法*

吴文理¹ 王秋玲¹ 郑东¹ 汤须崇²

摘要 目的:以煎煮法为基础,研究煎煮溶剂、煎煮时间、煎煮次数、溶剂量对炙甘草汤中有效成分甘草酸铵和人参皂苷 R_{g_1} 提取率的影响,并利用正交试验优化炙甘草汤的煎煮方法。**方法:**用 HPLC 检测甘草酸铵和人参皂苷 R_{g_1} 的含量,并以此作为评价指标,判断最佳煎煮方法。**结果:**炙甘草汤最佳煎煮方法为煎煮溶剂 4.6% 乙醇,煎煮时间 1 h,煎煮次数 2 次,溶剂量为药材量 10 倍。此时甘草酸铵的含量为 $0.9387 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$,人参皂苷 R_{g_1} 的含量为 $0.2214 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。**结论:**通过正交设计试验优选得到的炙甘草汤煎煮方法,甘草酸铵和人参皂苷 R_{g_1} 提取含量高,方法可行,可为临床应用提供依据。

关键词 炙甘草汤;甘草酸铵;人参皂苷 R_{g_1} ;煎煮方法;正交试验

炙甘草汤出自《伤寒论》,其功效益气养阴、通阳复脉,主治脉结代,心动悸,虚羸少气,舌苔少津之证,是临床治疗心血管类疾病的常用方,治疗心律失常疗效显著^[1]。现代临床应用对炙甘草汤的用法用量与东汉时期差异较大,东汉时期采用酒合水作为溶剂,溶剂量较大(方后注:酒七升,水八升),只煎煮 1 次,煎煮时间较长(十五升取三升)。现代的煎煮方法为水煎服,溶剂量较小(水没过药材 2~3 cm),通常煎煮 2 次,煎煮时间较短。由于煎煮溶剂、溶剂量等对有效成分的溶出度影响较大,因此不同的煎煮方法对中药汤剂的疗效会产生影响。

为探讨炙甘草汤合理的煎煮方法,提高炙甘草汤的临床疗效,选取合适的有效成分(炙甘草汤以炙甘草为君,人参辅助炙甘草补益心脾之气、化生气血为臣药,同时人参还是贵重的中药材,故选用这两个药材在 2020 版《中国药典》中所规定的药材质量检验的检测成分——甘草酸铵和人参皂苷 R_{g_1} 作为有效成分含量指标),通过设计正交试验,测定有效成分的溶出率,找到较优化的煎煮方法,为炙甘草汤的临床应用提供参考。

1 设备与材料

1.1 仪器与设备 高效液相色谱仪(Agilent, 型号 1260),电子天平(上海舜宇恒平公司,型号 JA5003),鼓风干燥箱(上海一恒仪器公司,型号 DHG-9075A)。

1.2 材料与试剂 炙甘草(亳州市永刚饮片厂有限公司,批号 210626),人参(浙江中医药大学饮片有限公司,批号 210501),生地黄(广东汇群中药饮片股份有限公司,批号 20210903),桂枝(甘肃佛慈红月药业有限公司,批号 D17132101ZF),麦冬(康美药业股份有限公司,批号 210900231),火麻仁(安徽新盛中药饮片有限公司,批号 210723114b),大枣(亳州市永刚饮片厂有限公司,批号 210701),以上饮片均具有按《中国药典》一部及四部检验合格的成品检验报告单。生姜为市场购得,经厦门市中医院郑东主任药师鉴别为正品。

甘草酸铵(批号 110731-202021, ID: 78L1-M3RY, 含量 $\geq 96.20\%$)、人参皂苷 R_{g_1} (批号 110703-202034, ID: 5SOT-LFFF, 含量 $\geq 94.00\%$)对照品(中国食品药品检定研究院)。

酒精(河南鑫河阳酒精有限公司,批号 2021-12-2/0,食用级),乙腈(上海星可高纯溶剂有限公司,批号 0114220306,色谱级),磷酸(批号 20190826,国药集团化学试剂有限公司,分析纯)、甲酸(批号 20180827,国药集团化学试剂有限公司,分析纯),甲醇(批号 P2015033,上海泰坦科技股份有限公司,分

*基金项目 2023 年全国中药特色技术传承人才培养项目(No. T20234832005);厦门市医疗卫生指导性项目(No.3502Z20209128)

• 作者单位 1.厦门市中医院(福建 厦门 361009);2.华侨大学先进碳转化技术研究院(福建 厦门 361021)

析纯)。

2 方法与结果

2.1 试验方法

2.1.1 炙甘草汤组方与剂量 根据柯雪帆等^[2]对东汉“光和大司农铜权”考证资料的核算,东汉时期1两约为15.625 g,一升约等于200 mL。方中的大枣30枚由于个头大小的差异,药物剂量无法准确计算;麦冬、火麻仁用升作为剂量单位,也会由于个头大小不同使得密度不同而造成重量差异。林轶群等^[3]分析了多篇非衡量单位的药物重量实测文献,其中红枣一枚共15个样本,均值为一枚3.1 g;麦冬一升共16个样本,均值为103.36 g;火麻仁一升共17个样本,均值为94.72 g。据此可折算出《伤寒论》中炙甘草汤各药剂量分别为:炙甘草62.50 g,人参31.25 g,生地黄249.70 g,桂枝46.88 g,阿胶31.25 g,麦门冬51.68 g,火麻仁47.36 g,生姜46.88 g,大枣93.00 g。以清酒1400 mL,水1600 mL,先煎取除阿胶外的8味药至药液600 mL,再烱化阿胶。因折算后的剂量与现代应用剂量有较大差距,故参考目前临床常用剂量,本实验选择原剂量的1/5作为剂量。由于阿胶为烱化后加入药液,煎煮方法对其不产生影响,故此次实验药方剔除阿胶。

本试验选定的炙甘草汤具体组方与剂量为:炙甘草12.50 g,人参6.25 g,生地黄49.94 g,桂枝9.38 g,麦门冬10.34 g,火麻仁9.47 g,生姜9.38 g,大枣18.60 g。

煎煮溶剂的选择:《伤寒论》中煎煮溶剂清酒合水为酒七升,水八升,清酒占溶剂的46%,据李兆^[4]考证,原方中的清酒度数约为10%(V/V),乙醇含量约为4.6%,故本试验以4.6%乙醇代替。

溶剂量的选择:原煎煮溶剂换算后共3000 mL,其1/5约为600 mL,约为药材量的5倍。现代用法参考周国运^[5]对炙甘草汤提取工艺的优选的结论,以10倍加水量,煎煮时间为1 h,炙甘草汤中有效成分均有较高的提取率,故另一水平溶剂量选用药材量的10倍,即1200 mL。

2.1.2 正交试验设计 以煎煮溶剂、煎煮时间、煎煮次数、溶剂量4个因素,根据不同条件,针对各煎煮方法设置2个水平,采用正交助手软件生成正交表试验设计(见表1、表2)。

2.1.3 煎煮方法 取炙甘草汤饮片于烧杯中,根据

表1 炙甘草汤试验因素及水平

水平	因素			
	煎煮溶剂	煎煮时间(h)	煎煮次数(次)	溶剂量
1	4.6%乙醇	2 h	1	药材量5倍
2	水	1 h	2	药材量10倍

表2 炙甘草汤正交试验设计

实验编号	因素			
	煎煮溶剂	煎煮时间(h)	煎煮次数(次)	溶剂量
1	1	2	2	2
2	2	1	2	1
3	1	2	2	1
4	1	1	1	1
5	2	1	2	2
6	2	2	1	1
7	1	1	1	2
8	2	2	1	2

设计的正交试验条件,加入相应的溶剂及溶剂量,用保鲜膜封口浸泡30 min。将烧杯用保鲜膜封口后置于恒温水浴锅中加盖加热,待药液温度升至95 °C时保持恒温,开始计时,按相应的煎煮时间及煎煮次数加热药液。如煎煮次数为2次,合并药液,待药液稍微冷却后过筛(400目),浓缩并最终统一定容至150 mL。

2.2 含量测定与结果

2.2.1 色谱条件 甘草酸铵:采用C18色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm)。流动相:乙腈(A)-0.05%磷酸溶液(B)。流速:1.0 mL·min⁻¹。检测波长:237 nm。进样量:10 μL。柱温:25 °C。按表3-1中的规定进行梯度洗脱。

人参皂苷 Rg₁:采用C18色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm)。流动相:乙腈(A)22%-0.1%磷酸溶液(B)78%。流速:1.0 mL·min⁻¹。检测波长:203 nm。进样量:10 μL。柱温:30 °C。按表3-2中的规定进行梯度洗脱。

表3-1 甘草酸铵洗脱梯度表

时间(min)	流动相A(%)	流动相B(%)
0~8	19	81
8~35	19→50	81→50
35~36	50→100	50→0
36~40	100→19	0→81
40~45	19	81

表3-2 人参皂苷R_{g1}洗脱梯度表

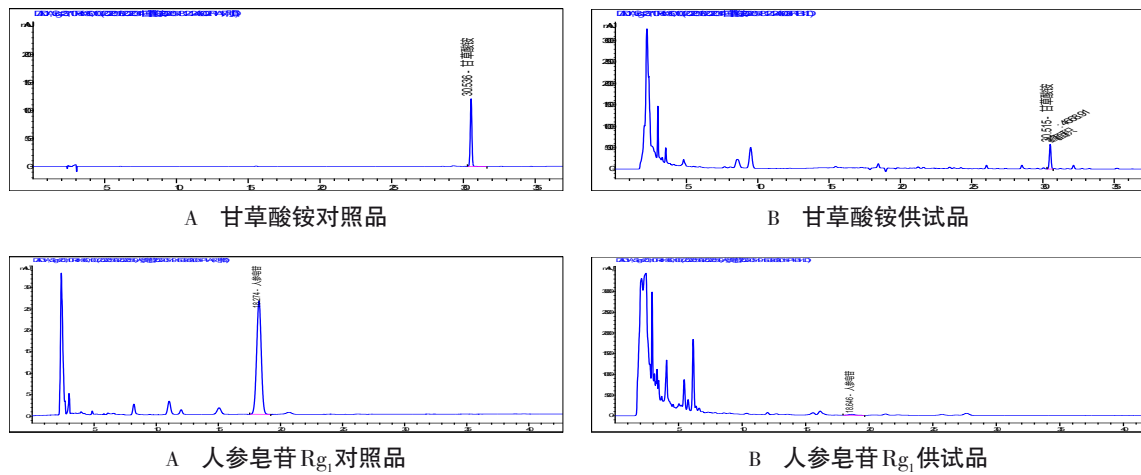
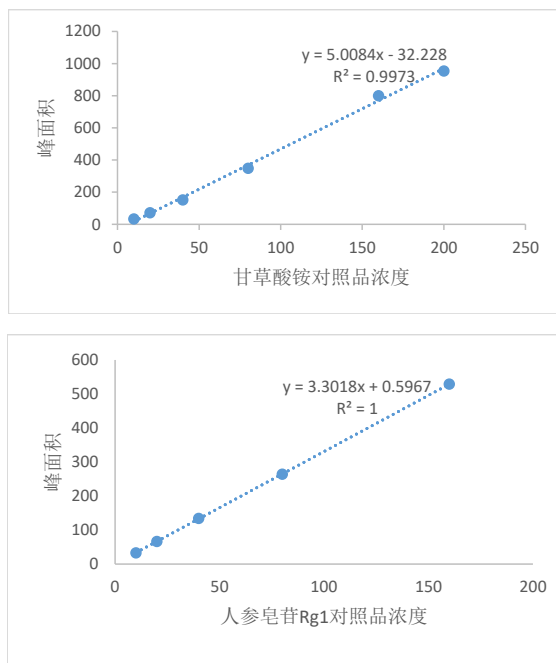
时间(min)	流动相A(%)	流动相B(%)
0~50	22	78

2.2.2 溶液的制备 (1)对照品溶液的制备:取甘草酸铵对照品适量,精密称定,加70%乙醇分别制成每1 mL含甘草酸铵0.2 mg的溶液,即得(甘草酸重量=甘草酸铵重量/1.0207);精密称取人参皂苷R_{g1}对照品加甲醇制成每1 mL含0.2 mg的溶液,摇匀,即得。

(2)供试品溶液的制备:按正交实验表方法煎煮炙甘草汤,取煎煮后的药液,冷却后过筛(400目),浓

缩并最终定容至150 mL,过0.22 μm微孔滤膜,取上清液,即得供试品溶液。

2.2.3 线性关系 精密吸取上述对照品溶液配制成的不同浓度(10、20、40、80、160 μg·mL⁻¹)的系列溶液,按“2.2.1”项下色谱条件分别进样,记录峰面积。以对照品浓度(x, μg·mL⁻¹)为横坐标,以峰面积(y)为纵坐标,制作线性标准曲线。甘草酸铵的标准曲线: $y=5.0084x-32.228$ (相关系数 $R^2=0.9973$)。人参皂苷R_{g1}的标准曲线: $y=3.3018x+0.5967$ (相关系数 $R^2=1$)。见图1、图2。

图1 甘草酸铵和人参皂苷R_{g1}对照品和供试品HPLC图图2 甘草酸铵和人参皂苷R_{g1}标准曲线

2.2.4 精密度 取浓度80 μg·mL⁻¹的对照品溶液,按“2.2.1”项下色谱条件连续进样5次,甘草酸铵对照品的峰面积RSD=1.73%,人参皂苷R_{g1}的峰面积RSD=0.92%表明仪器的精密度良好。

2.2.5 重复性 按“2.1.3”项下1号方法制备供试品溶液5份,按“2.2.1”项下色谱条件连续进样,供试品溶液甘草酸铵的峰面积RSD=2.01%,人参皂苷R_{g1}的峰面积RSD=1.58%,表明本方法重现性良好。

2.2.6 稳定性 按“2.1.3”项下1号方法制备供试品溶液,分别于制备后的1、2、4、8、12 h进样测定,供试品溶液甘草酸铵的峰面积RSD=1.93%,人参皂苷R_{g1}的峰面积RSD=1.44%,表明本方法制备的溶液在12 h内稳定性良好。

2.2.7 加样回收测定 按“2.1.3”项下1号方法制备供试品溶液5份,分别精密取5 mL供试品溶液,定容至10 mL,加入一定体积的对照品溶液,进行加样回收考察。结果表明甘草酸铵的回收率为97.8%,RSD=1.82%,人参皂苷R_{g1}的回收率为99.7%,RSD=1.16%。

2.2.8 含量测定 取8组炙甘草汤饮片,每组3份,分别按正交表的方法煎煮,按“2.2.3”制备供试品溶液,按“2.2.1”项下色谱条件分别进样,计算含量。在3份样品两个成分的平均含量分别见表4、表5。

根据表4所示,以甘草酸铵的含量为响应值,影响程度依次为C>D>A>B,即煎煮次数>溶剂量>煎煮溶剂>煎煮时间。通过极差分析得到甘草酸铵的煎煮方法最优组合为A₁B₂C₂D₂。以人参皂苷Rg₁的含量为

响应值,几个因素的影响程度依次为D>A>C>B,即溶剂量>煎煮溶剂>煎煮次数>煎煮时间。通过极差分析得到人参皂苷Rg₁的煎煮方法最优组合为A₁B₂C₂D₂。两个主要有效成分的煎煮方法最优组合均为A₁B₂C₂D₂,即煎煮溶剂4.6%乙醇,煎煮时间1 h,煎煮次数2次,溶剂量为药材量10倍。在此试验条件下,甘草酸铵的含量为0.9387 mg·mL⁻¹,人参皂苷Rg₁的含量为0.2214 mg·mL⁻¹。

表4 甘草酸铵和人参皂苷Rg₁含量测定正交试验结果

实验编号	A煎煮溶剂	B煎煮时间	C煎煮次数	D溶剂量	甘草酸铵含量(mg·mL ⁻¹)	人参皂苷Rg ₁ 含量(mg·mL ⁻¹)
1	1	2	2	2	0.9387	0.2214
2	2	1	2	1	0.4928	0.1440
3	1	2	2	1	0.5459	0.1742
4	1	1	1	1	0.2226	0.1361
5	2	1	2	2	0.6929	0.1677
6	2	2	1	1	0.1963	0.0939
7	1	1	1	2	0.4837	0.1789
8	2	2	1	2	0.3111	0.2038
甘草酸铵 K ₁	2.1909	1.8920	1.2137	1.4576		
K ₂	1.6931	1.9920	2.6703	2.4264		
R	0.1245	0.025	0.3642	0.2422		
人参皂苷Rg ₁ K ₁	0.7106	0.6267	0.6127	0.5482		
K ₂	0.6094	0.6933	0.7073	0.7718		
R	0.0253	0.0167	0.0237	0.0559		

表5 甘草酸铵和人参皂苷Rg₁含量测定正交试验方差分析

来源	偏差平方和		自由度		F比		F临界值	
	甘草酸铵	人参皂苷Rg ₁	甘草酸铵	人参皂苷Rg ₁	甘草酸铵	人参皂苷Rg ₁	甘草酸铵	人参皂苷Rg ₁
煎煮溶剂	0.265	0.001	1	1	2.560	0.444		
煎煮时间	0.031	0.001	1	1	0.300	0.444		
煎煮次数	0.001	0.001	1	1	0.010	0.444	7.710	7.710
溶剂量	0.117	0.006	1	1	1.130	2.667		
误差	0.410	0.010	4	4				

2.2.9 验证试验 按上述优选出来的煎煮方法A₁B₂C₂D₂测定甘草酸铵和人参皂苷Rg₁含量,平行试验的结果为甘草酸铵的含量均值为0.9337 mg·mL⁻¹,

人参皂苷Rg₁的含量均值为0.2267 mg·mL⁻¹,表明优选的煎煮方法条件符合预期结果,煎煮方法稳定可行,正交试验优选方案合理,结果见表6。

表6 甘草酸铵和人参皂苷Rg₁含量测定验证试验结果

编号	甘草酸铵含量(mg·mL ⁻¹)	均值(mg·mL ⁻¹)	RSD(%)	人参皂苷Rg ₁ 含量(mg·mL ⁻¹)	均值(mg·mL ⁻¹)	RSD(%)
1	0.9353			0.2301		
2	0.9256	0.9337	0.8	0.2264	0.2267	1.4
3	0.9402			0.2238		

3 讨论

由正交试验分析可知,炙甘草汤的煎煮方法中,

煎煮溶剂、煎煮时间、煎煮次数及溶剂量对汤剂中甘草酸铵及人参皂苷Rg₁的含量有显著影响。最终得到

的最佳煎煮方法为煎煮溶剂4.6%乙醇,煎煮时间为1 h,煎煮次数2次,溶剂量为药材量10倍。

炙甘草汤中含有阿胶,约占全方重量的5%,其质地黏腻,可影响其他药物有效成分的溶出且容易吸附其他有效成分,增加有效成分检测的难度,并会降低药液中有效成分的含量,影响有效成分的提取检测。由于阿胶烱化后才加入煎煮好的药液中,并不成为其他药物的煎煮过程中的影响因素。为避免阿胶对其他主要有效成分的影响,在检测甘草酸铵、人参皂苷R_{g1}时采用未加入阿胶的药液。

炙甘草汤原方用清酒合水煎煮药物。清酒温,且微酸微甜,度数较低,能升能散,具有活血通络、祛风散寒、矫臭矫味的作用,同时还可避免白酒(高浓度蒸馏酒)对心律失常等病症的不良刺激^[6]。清酒含水谷之气,还具有一定的补益作用。取清酒合水作为溶剂,一是增强行气血、助通脉、补虚扶弱之功(例如清酒与生地黄共煎,为类似熟地黄的炮制方法,可在一定程度上抑制生地黄寒凉之弊);二是乙醇作为亲水性的有机溶剂,可以与水任意比例混合,具有较强的穿透药材细胞的能力,能溶解大多数药材的成分。中药成分复杂,既包含水溶性成分,也有脂溶性成分,乙醇作为提取溶剂较水的提取效果更好。因此,酒水合煎能够提高炙甘草汤中各有效成分的浸出量与浸出速度,进而增强炙甘草汤的临床疗效^[7]。本试验中主要探讨溶剂对有效成分溶出度的影响,为避免清酒中其他成分带来干扰,故选用相同浓度的乙醇作为溶剂。

麦冬作为臣药可滋阴养血补心,所含主要化学成分皂苷类化合物是其药材质量控制的关键性指标,更是麦冬发挥广泛药理作用的极其重要的活性成分。麦冬甙体皂苷中的鲁斯可皂苷元是其质量控制的关键性指标,是2020年版《中国药典(一部)》规定的麦冬药材质量检验的检测成分。麦冬甙体皂苷类化学成分的药理学作用显著,麦冬总皂苷可抗心肌缺血活性,对心肌细胞缺氧再给氧损伤具有保护作用,从而发挥保护心肌细胞的作用^[8]。同时,麦冬总皂苷还可以改善微循环、抗血栓^[9]与抗心律失常^[10]。

本试验还检测了鲁斯可皂苷元的含量,色谱条件为采用C18色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm);流动相:乙腈(A)-0.06%甲酸溶液(B);流速:1.0 mL·min⁻¹;

检测波长:205 nm;进样量:10 μL;柱温:55 °C;梯度洗脱(0~45 min, 37%B)。精密称取鲁斯可皂苷元对照品(批号111909-201906, ID: OAGG-KEKX, 含量≥98.00%, 中国食品药品检定研究院),加甲醇制成浓度为0.2 mg·mL⁻¹的混合溶液。精密吸取上述对照品溶液配制成的不同浓度(10、20、40、80、160 μg·mL⁻¹)的系列溶液,制作线性标准曲线。得标准曲线 $y=3.9448x-1.2616$,相关系数 $R^2=1$ 。但是8组炙甘草汤,每组3份共24份供试品溶液均未检测出鲁斯可皂苷元。由于鲁斯可皂苷元可溶于氯仿、石油醚等溶剂,不易溶于水,因此麦冬总皂苷的优化提取工艺一般采用50%~70%的高浓度乙醇^[11-12],水提和低浓度醇提较难提取出鲁斯可皂苷元。

本试验得出的最佳煎煮方法可为炙甘草汤的临床应用提供一个新方案,也为炙甘草汤制剂的开发提供一些参考。

参考文献

- [1]王安铸,马晓昌.炙甘草汤临床应用研究进展[J].世界中医药,2020,15(11):1662-1665.
- [2]柯雪帆,赵章忠,张玉萍,等.《伤寒论》和《金匱要略》中的剂量问题[J].上海中医药杂志,1983,17(12):36-38
- [3]林铁群,穆兰澄,李青伟,等.非衡量单位药物重量实测文献汇总分析[J].中华中医药杂志,2018,33(2):740-743.
- [4]李兆.酒与两汉社会[D].太原:山西大学,2014.
- [5]周国运,黄雨威,徐惠芳,等.正交试验法优选炙甘草汤的提取工艺[J].湖北中医药大学学报,2017,19(2):41-44.
- [6]张尊如,王永梅.关于炙甘草汤中清酒问题的探讨[J].中国中医基础医学杂志,2001,7(7):541-542.
- [7]贾亚玲,冯泳,陈丽丽.炙甘草汤清酒探析[J].现代中医药,2015,35(5):140-142.
- [8]于晓文,杜鸿志,孙立,等.麦冬皂苷药理作用研究进展[J].药学进展,2014,38(4):279-284
- [9]KOU J P, TIAN Y Q, YU B Y. Antithrombotic activities of aqueous extract from Radix Ophiopogon japonicas and its two constituents [J]. Biol Pharm Bull, 2006, 29(6): 1267-1270.
- [10]范明明,张嘉裕,张湘龙,等.麦冬的化学成分和药理作用研究进展[J].中医药信息,2020,37(4):130-134.
- [11]林韵涵,李崇明,李晓东,等.湖北麦冬有效部位总皂苷的提取纯化工艺研究[J].中药材,2013,36(5):803-806.
- [12]王思思,包永睿,孟宪生,等.麦冬有效组分的提取工艺及组分与药效相关性分析[J].时珍国医国药,2013,24(3):559-561.

(收稿日期:2023-06-01)

(本文编辑:黄明愉)