

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2020.11.004

正交试验设计优选茵陈蒿汤水煎煮工艺*

沈 晗¹, 黄玉宇^{1,2△}, 陈 汀², 沈夕坤²

(1. 安徽中医药大学, 安徽 合肥 230012; 2. 南京中医药大学附属苏州市中医医院, 江苏 苏州 215009)

摘要:目的 优选茵陈蒿汤的水煎煮工艺。方法 以浸泡时间、加水量和煎煮时间为影响因素设计正交试验,以新绿原酸、绿原酸、咖啡酸、栀子苷、异绿原酸 B、芦荟大黄素、大黄素甲醚、大黄酸、大黄酚、大黄素的含量和浸膏得率为评价指标,优选茵陈蒿汤最佳煎煮工艺。结果 茵陈蒿汤最佳煎煮工艺为加 18 倍量的水浸泡 50 min 后,再煎煮 30 min,浸膏得率为 23.54%;新绿原酸、绿原酸、咖啡酸、栀子苷、异绿原酸 B、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚的含量分别为 0.406 6, 0.459 5, 0.047 6, 1.795 9, 0.262 5, 0.016 1, 0.778 7, 0.017 3, 0.005 9, 0.002 9 mg/g;综合评分为 98.28 分。结论 该方法稳定可行,可作为茵陈蒿汤的煎煮工艺标准。

关键词:茵陈蒿汤;煎煮工艺;多指标成分;正交试验

中图分类号:R932;R283

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2020)11-0014-04

Optimization of the Water Extraction for Yinchenhao Decoction by Orthogonal Experimental Design

SHEN Han¹, HUANG Yuyu^{1,2}, CHEN Ting², Shen Xikun²

(1. Anhui University of Chinese Medicine, Hefei, Anhui, China 230012; 2. Suzhou Hospital of Traditional Chinese Medicine Affiliated to Nanjing University of Chinese Medicine, Suzhou, Jiangsu, China 215009)

Abstract: **Objective** To optimize the processing of Yinchenhao Decoction. **Methods** Orthogonal experiment was designed by influence factors of soaking time, additional quantity of water and decocting time to optimize the processing of Yinchenhao Decoction, and neochlorogenic acid, chlorogenic acid, caffeic acid, B-isochlorogenic acid, geniposide, aloe-emodin, rhein, emodin, chrysophanol, physcion and the yield of extraction were used as evaluation indicators. **Results** The best processing of Yinchenhao Decoction was that when the water amount was added 18 times, the soaking time was 50 min and decocting time was 30 min, with the extraction rate of 23.54%; the contents of neochlorogenic acid, chlorogenic acid, caffeic acid, B-isochlorogenic acid, geniposide, aloe-emodin, rhein, emodin, chrysophanol, physcion were respectively 0.406 6, 0.459 5, 0.047 6, 1.795 9, 0.262 5, 0.016 1, 0.778 7, 0.017 3, 0.005 9, 0.002 9 mg/g. The comprehensive score was 98.28. **Conclusion** This method is stable and feasible to be regarded as the decocting criterion of Yinchenhao Decoction.

Key words: Yinchenhao Decoction; processing of decoction; multi-index; orthogonal experiment

茵陈蒿汤源于《伤寒论》,由茵陈、栀子和大黄组方,常用于治疗湿热黄疸。方中茵陈苦寒,降泄、清肝胆湿热,为君药;栀子性寒,清三焦之火,为臣药;大黄泻热通利,为佐药^[1]。三药共用,通利二便,使黄疸渐消。茵陈中的绿原酸等成分及栀子中的栀子苷均有保肝利胆作用^[2-5];大黄中的大黄酸、大黄素等成分可作用于消化系统,对胰腺和肝脏有保护和修复作用。茵陈蒿汤具有利胆、护肝等作用,对于急性黄疸型肝炎、胆囊炎、胆石症等疗效良好^[6-9]。茵陈蒿汤疗效的显著与否除与药材质量有关外,其煎煮工艺也有影响。本研究中以浸泡时间、加水量和煎煮时间为影响因素,以浸膏得率和药材主要成分的含量为衡量指标探讨茵陈蒿汤的水煎煮工艺。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Agilent 1260 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公

司); AG285 型电子分析天平(精度为万分之一), AX26DR 型电子天平(精度为百分之一),均购自瑞典梅特勒-托利多公司; KQ-300VDB 型超声仪(昆山市超声仪器有限公司,双频为 45 Hz/80 Hz); KDC-140R 型超速离心机(安徽中科中佳科学仪器有限公司); Direct-Q3UV 型超纯水仪(美国密理博公司)。

1.2 试药

对照品绿原酸(批号为 110753-201415,纯度为 96.2%),栀子苷(批号为 07499605),芦荟大黄素(批号为 110795-201710,纯度为 98.3%),大黄酸(批号为 110757-200206),大黄素(批号为 1110756-200110),大黄酚(批号为 110796-201319,纯度为 99.6%),大黄素甲醚(批号为 110758-201616,纯度为 99.0%),咖啡酸(批号为 110885-201703,纯度为 99.7%),均购自中国食品药品检定研究院;新绿原酸(批号为 4974,纯度为 98.0%),异绿原酸 B(批号为 3089,纯度为 98%),

*基金项目:江苏省苏州市产业技术创新专项[SYSD2017177]。

第一作者:沈晗,女,在读硕士研究生,研究方向为中药制剂与生产,(电子信箱)2530355665@qq.com。

△通信作者:黄玉宇,女,大学本科,硕士研究生导师,主任中药师,研究方向为临床药学,(电子信箱)yuyuhuang-sz@163.com。

均购自上海诗丹德生物技术有限公司;茵陈(批号为190216,产地为江苏),栀子(批号为181113),均购自苏州市天灵饮片公司;大黄(批号为190517,产地为甘肃,苏州市博源药业有限公司);乙腈为色谱纯,水为超纯水,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 正交试验设计

按处方比例,称取5剂药材,置不锈钢锅中煎煮,煎煮2次,煎煮液浓缩至300 mL。以浸泡时间(因素A)、加水量(因素B)、煎煮时间(因素C)和空白项(因素D)为考察因素,设计正交试验。因素水平见表1。

表1 正交试验因素水平

水平	因素 A(min)	因素 B(倍)	因素 C(min)	因素 D(空白)
1	30	10	20	1
2	40	14	30	2
3	50	18	40	3

2.2 浸膏得率测定

取表1因素水平下制备的9份浓缩液50 mL,置已干燥至恒重的陶瓷蒸发皿中,于99.9℃水浴锅上蒸干,再置105℃烘箱中干燥3 h后取出,放入干燥器中冷却0.5 h,迅速称定质量,计算出膏率。

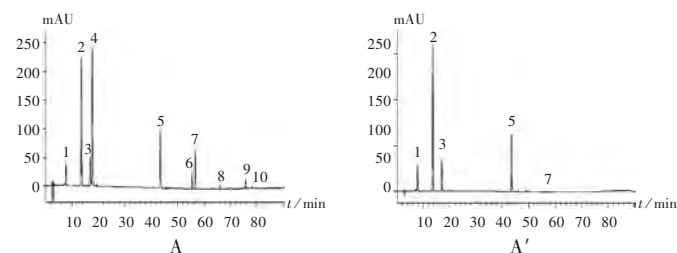
2.3 指标性成分含量测定

2.3.1 色谱条件

色谱柱:Agilent Zorbax Eclipse XDB-C₁₈柱(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:乙腈(A)-0.1%磷酸溶液(B),梯度洗脱(程序见表2);流速:1.0 mL/min;柱温:30℃;检测波长:254,327 nm;进样量:5 μL。在此色谱条件下的色谱图见图1。

2.3.2 溶液制备

对照品溶液:取栀子苷、新绿原酸、咖啡酸、绿原酸、异绿原酸B、芦荟大黄素、大黄素甲醚、大黄酸、大黄酚、大黄素对照品适量,精密称定,置10 mL容量瓶中,加甲醇溶解,制成质量浓度分别为0.494 0,0.365 2,0.175 0,0.032 9,0.260 6,0.011 3,0.002 7,0.364 6,0.005 2,0.006 8 mg/mL的混合溶液,即得。



1. 新绿原酸 2. 绿原酸 3. 咖啡酸 4. 栀子苷 5. 异绿原酸 B 6. 芦荟大黄素
7. 大黄酸 8. 大黄素 9. 大黄酚 10. 大黄素甲醚

A. 对照品溶液(254 nm) A'. 对照品溶液(327 nm) B. 供试品溶液(254 nm) B'. 供试品溶液(327 nm)

图1 高效液相色谱图

表2 流动相梯度洗脱程序(%)

时间(min)	A(%)	B(%)	时间(min)	A(%)	B(%)
0~29	8→15	92→85	48~68	45→55	55→45
29~41	15→20	85→80	68~78	55→90	45→10
41~48	20→45	80→55	78~82	90→100	10→0

供试品溶液:取2.1项下制备的茵陈蒿汤水煎液9份,每份10 mL,置25 mL容量瓶中,精密加入甲醇14 mL,超声处理30 min,取出冷却,加甲醇定容至刻度,离心,取上清液,0.45 μm微孔滤膜滤过,即得,编号为S1~S9。

2.3.3 方法学考察

线性关系考察:将2.3.2项下对照品溶液稀释成不同梯度的溶液,按拟订色谱条件进样5 μL,以溶液质量浓度(X)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归。结果见表3。

表3 各成分线性关系考察结果

成分	回归方程	相关系数(R ²)	质量浓度范围(μg/mL)
栀子苷	$Y = 1118.8X + 65.047$	0.999 9	494~2 964
新绿原酸	$Y = 462.03X - 36.393$	0.999 4	175~1 050
绿原酸	$Y = 1 694.4X + 66.367$	0.999 8	365.2~2 191.2
咖啡酸	$Y = 142.78X - 7.573 3$	0.999 4	32.9~197.4
异绿原酸 B	$Y = 622.68X - 56.673$	0.999 8	260.6~1 563.6
芦荟大黄素	$Y = 56.631X - 0.96$	0.999 1	11.3~67.8
大黄酸	$Y = 258.88X - 77.273$	0.999 8	364.6~2 187.6
大黄素	$Y = 20.274X - 3.06$	0.999 9	6.8~40.8
大黄酚	$Y = 24.669X - 0.54$	1.000 0	5.2~31.2
大黄素甲醚	$Y = 5.3114X - 0.44$	0.999 6	2.7~16.2

精密度试验:依法取同一混合对照品溶液,按拟订色谱条件进样测定6次。结果新绿原酸、绿原酸、咖啡酸、栀子苷、异绿原酸B、芦荟大黄素、大黄素甲醚、大黄酸、大黄酚、大黄素峰面积的RSD分别为1.18%,0.50%,1.15%,0.65%,1.13%,0.22%,0.86%,2.30%,3.90%,2.70%(n=6),表明仪器精密度良好。

重复性试验:依法平行制备6份S9供试品溶液,按拟订色谱条件进样测定。结果新绿原酸、绿原酸、咖啡

酸、栀子苷、异绿原酸 B、芦荟大黄素、大黄素甲醚、大黄酸、大黄酚、大黄素峰面积的 RSD 分别为 0.59% , 0.60% , 0.53% , 0.28% , 1.73% , 0.38% , 2.14% , 2.30% , 3.64% , 1.49% ($n=6$) , 表明方法重复性良好。

稳定性试验:依法制备 S9 供试品溶液,于 0,3,6,9,16,24 h 时按拟订色谱条件进样测定。结果新绿原酸、绿原酸、咖啡酸、栀子苷、异绿原酸 B、芦荟大黄素、大黄素甲醚、大黄酸、大黄酚、大黄素峰面积的 RSD 分别为 0.70% , 0.62% , 1.30% , 0.22% , 1.34% , 0.30% , 0.93% , 2.47% , 2.32% , 1.43% ($n=6$) , 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

加样回收试验:依法平行制备 6 份 S9 供试品溶液,每份 1 mL,分别置 10 mL 容量瓶中,加入等体积的混合对照品溶液,加甲醇定容至刻度。按拟订色谱条件进样测定,并计算回收率。结果见表 4。

2.4 多指标成分加权分析

将总体设置为 100 分,由于茵陈和栀子在茵陈蒿汤中比例较高,故将新绿原酸、绿原酸、咖啡酸、异绿原酸 B 和栀子苷的含量权重系数均设置为 10 分;由于大黄素甲醚成分含量较少,大黄素甲醚在酸性或加热条件下易发生水解而转化成大黄素^[10]。故将游离蒽醌类成分作为一个总体,其含量权重系数设置为 20 分;由于浸膏代表整个方剂,将其权重系数设为 30 分。综合评分 = $10.0 \times \text{新绿原酸含量} / \text{最大值} + 10.0 \times \text{绿原酸含量} / \text{最大值} + 10.0 \times \text{咖啡酸含量} / \text{最大值} + 10.0 \times \text{异绿原酸 B 含量} / \text{最大值} + 10.0 \times \text{栀子苷含量} / \text{最大值} + 20.0 \times \text{总游离蒽醌含量} / \text{最大值} + 30.0 \times \text{浸膏得率} / \text{最大值}$ 。结果见表 5,方差分析见表 6。可见,各因素对浸出物和指标性成分的影响度依次为 $A > B > C$,即浸泡时间 > 加水量 > 煎煮时间;浸泡时间对结果影响最大,这可能

表 4 加样回收试验结果 ($n=6$)

成分	样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD (%)	成分	样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD (%)
新绿原酸	0.298 1	0.175	0.478 7	103.20	101.33	1.93	芦荟大黄素	0.011 2	0.011 3	0.022 4	99.12	100.88	1.66
	0.304 6	0.175	0.481 7	101.20				0.011 7	0.011 3	0.023 1	100.88		
	0.302 7	0.175	0.477 3	99.77				0.011 5	0.011 3	0.022 7	99.12		
	0.301 8	0.175	0.479 1	101.31				0.012 4	0.011 3	0.024 1	103.54		
	0.297 2	0.175	0.469 9	98.69				0.012 1	0.011 3	0.023 6	101.77		
绿原酸	0.307 4	0.175	0.489 1	103.83	102.51	1.11	大黄酸	0.011 7	0.011 3	0.023 1	100.88	100.85	0.93
	0.410 8	0.365 2	0.783 7	102.11				0.511 2	0.364 6	0.879 1	100.91		
	0.411 3	0.365 2	0.783 9	102.03				0.513 1	0.364 6	0.883 5	101.59		
	0.410 5	0.365 2	0.778 3	100.71				0.498 1	0.364 6	0.860 3	99.34		
	0.401 7	0.365 2	0.781 1	103.89				0.513 2	0.364 6	0.880 7	100.80		
咖啡酸	0.411 5	0.365 2	0.788 1	103.12	101.52	1.60	大黄素	0.512 7	0.364 6	0.878 9	100.44	99.75	2.54
	0.410 1	0.365 2	0.787 1	103.23				0.506 8	0.364 6	0.878 8	102.03		
	0.037 1	0.032 9	0.069 8	99.39				0.007 1	0.006 8	0.014 1	102.94		
	0.037 1	0.032 9	0.070 2	100.61				0.006 9	0.006 8	0.013 6	98.53		
	0.036 6	0.032 9	0.070 5	103.04				0.006 8	0.006 8	0.013 7	101.47		
栀子苷	0.036 5	0.032 9	0.070 6	103.65	100.81	1.07	大黄酚	0.007 3	0.006 8	0.013 9	97.06	99.68	2.56
	0.037 3	0.032 9	0.070 4	100.61				0.007 2	0.006 8	0.014 1	101.47		
	0.037 2	0.032 9	0.070 7	101.82				0.007 1	0.006 8	0.013 7	97.06		
	0.871 2	0.494	1.369 1	100.79				0.004 6	0.005 2	0.009 9	101.92		
	0.872 2	0.494	1.371 4	101.05				0.004 5	0.005 2	0.009 8	101.92		
异绿原酸 B	0.871 6	0.494	1.365 3	99.94	100.33	1.04	大黄素甲醚	0.004 3	0.005 2	0.009 4	98.08	99.38	4.95
	0.872 1	0.494	1.378 7	102.55				0.004 3	0.005 2	0.009 3	96.15		
	0.871 5	0.494	1.362 7	99.43				0.004 2	0.005 2	0.009 3	98.08		
	0.871 1	0.494	1.370 4	101.07				0.004 4	0.005 2	0.009 7	101.92		
	0.261 4	0.260 6	0.521 2	99.69				0.001 4	0.002 7	0.004 2	103.70		
	0.261 6	0.260 6	0.525 4	101.23	100.33	1.04		0.001 3	0.002 7	0.003 9	96.30	99.38	4.95
	0.261 8	0.260 6	0.527 7	102.03				0.001 5	0.002 7	0.004 1	96.30		
	0.261 7	0.260 6	0.522 0	99.88				0.001 3	0.002 7	0.004 1	103.70		
	0.261 6	0.260 6	0.520 8	99.46				0.001 4	0.002 7	0.004 2	103.70		
	0.262 1	0.260 6	0.521 9	99.69				0.001 6	0.002 7	0.004 1	92.59		

是因为茵陈质地轻浮,易漂浮在水面,不易被水浸润;又由于质地较疏松,有效成分会被快速煎出。故茵陈蒿汤的煎煮工艺确定为 A₃B₃C₂,即加 18 倍量水浸泡 50 min 后煎煮 30 min。

2.5 最佳工艺验证

按最佳煎煮工艺,同时煎煮 3 批茵陈蒿汤,将所得数据进行分析,结果 3 批茵陈蒿汤的综合评分分别为 98.51,98.63,97.71 分,平均为 98.28 分。可见该煎煮工艺提取率高,且稳定可行。

表 5 正交试验设计及结果 (n=9)

序号	因素 A (min)	因素 B (倍)	因素 C (min)	因素 D (空白)	浸膏得率 (%)	新绿原酸 (mg/g)	绿原酸 (mg/g)	咖啡酸 (mg/g)	异绿原酸 B (mg/g)	栀子苷 (mg/g)	芦荟大黄素 (mg/g)	大黄酸 (mg/g)	大黄素 (mg/g)	大黄酚 (mg/g)	大黄素甲醚 (mg/g)
1	1	1	1	1	18.624 8	0.342 5	0.495 2	0.037 9	0.226 8	1.089 1	0.010 3	0.573 6	0.008 9	0.005 6	0.001 4
2	1	2	2	2	20.288 3	0.503 9	0.412 7	0.046 9	0.282 4	1.252 5	0.012 0	0.664 0	0.011 0	0.005 3	0.001 4
3	1	3	3	3	24.254 5	0.464 6	0.411 6	0.043 2	0.270 3	1.749 1	0.011 3	0.591 2	0.010 4	0.004 0	0.001 1
4	2	1	2	3	21.456 8	0.450 9	0.556 2	0.048 4	0.299 3	1.568 5	0.011 0	0.651 5	0.009 5	0.005 4	0.001 6
5	2	2	3	1	22.436 0	0.505 7	0.427 6	0.046 8	0.292 0	1.491 3	0.010 2	0.671 7	0.013 7	0.005 4	0.001 4
6	2	3	1	2	22.281 8	0.556 3	0.424 1	0.053 1	0.312 6	1.314 6	0.009 7	0.565 4	0.010 4	0.003 5	0.001 1
7	3	1	3	2	22.143 8	0.388 0	0.482 7	0.041 1	0.265 6	1.489 5	0.012 9	0.788 5	0.014 0	0.005 3	0.001 3
8	3	2	1	3	21.183 5	0.563 4	0.441 2	0.050 7	0.323 8	1.266 5	0.011 9	0.738 5	0.013 9	0.004 4	0.001 8
9	3	3	2	1	23.516 8	0.553 7	0.476 6	0.051 3	0.351 1	1.775 0	0.015 5	0.808 7	0.019 0	0.005 7	0.001 9
K ₁	80.616 0	82.405 6	82.545 5	85.984 9											
K ₂	87.076 8	86.254 0	89.446 1	85.139 0											
K ₃	91.283 3	90.316 4	86.984 4	87.852 1											
R	10.667 2	7.910 8	6.900 6	2.713 1											

表 6 方差分析

方差来源	离均差	自由度	均方	F 值	P 值
A	173.27	2	86.61	2.91	0.13
B	93.90	2	46.95	1.09	0.39
C	73.38	2	36.69	0.79	0.50
误差	11.56	2	5.78	0.10	0.91

3 讨论

参照 2015 年版《中国药典(一部)》给定的波长(栀子为 238 nm^{[11]248},大黄为 254 nm^{[11]23},茵陈为 327 nm^{[11]239})并结合二极管阵列检测器的全波长扫描,结果在 238 nm 波长下出峰多,栀子苷含量高,但所测成分分离度不好,且咖啡酸成分在此波长下检测不到;254 nm 波长下,所测得大黄各成分分离度较好,且含量较高,栀子苷在此波长下含量也较高,且分离度较好,但咖啡酸含量检测不到;327 nm 波长下,新绿原酸、绿原酸、咖啡酸和异绿原酸 B 各成分含量高、分离度好、峰形好,但其他待测成分几乎检测不到。故选取 254 nm 和 327 nm 双波长作为检测波长。

通过正交试验,最终确定了茵陈蒿汤的最佳水煎煮工艺,为茵陈蒿汤的煎煮提供了标准和质量保障。此外,还发现茵陈蒿汤加水量比一般方剂要多,这可能是因茵陈吸水系数较大,故对于含有草药类的方剂应酌情添加水量。

中药汤剂是中医治疗疾病的传统剂型,是中医临床应用最广泛的剂型,也是制备其他剂型的基础。汤剂煎煮的好坏会直接影响疾病治疗效果,故应严格把控中药

汤剂的煎煮工艺,在遵循相关煎煮规范的同时,应根据方剂中药材的质地来确定其煎煮因素,并形成各自的煎煮规范标准。

参考文献:

- [1] 李 冀. 方剂学[M]. 第 3 版. 北京:中国中医药出版社, 2012:12.
- [2] 刘玉萍,邱小玉,刘 辉,等. 茵陈的药理作用研究进展[J]. 中草药,2019,50(9):2235-2241.
- [3] 史永平,孔浩天,李昊楠,等. 栀子的化学成分、药理作用研究进展及质量标志物预测分析[J]. 中草药,2019,50(2):281-289.
- [4] 徐 姣,赵 嵘,代云桃,等. 栀子标准汤剂的质量评价方法考察[J]. 中国实验方剂学杂志,2017,23(7):30-35.
- [5] 杜怡雯,冯江毅,胡黎文,等. 大黄的药理活性研究及临床应用[J]. 中医临床研究,2018,10(25):24-27.
- [6] 张保国,刘庆芳. 茵陈蒿汤近年临床运用[J]. 中成药,2011,33(3):502-505.
- [7] 杨爱华,窦志华. 茵陈蒿汤药效物质基础研究方法与配伍机制的研究进展[J]. 中国药房,2013,24(19):1812-1814.
- [8] 冷 静. 茵陈蒿汤药理作用和临床应用进展[J]. 内蒙古中医药,2016,35(7):131-133.
- [9] 康庆伟,阎 姝. 茵陈蒿汤的药理作用及临床应用进展[J]. 中国中西医结合外科杂志,2013,19(4):473-475.
- [10] 赵曼佳,赵 嵘,代云桃,等. 大黄标准汤剂质量评价[J]. 中国中药杂志,2018,43(5):861-867.
- [11] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015.

(收稿日期:2019-11-26)