

中图分类号: R94 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2025)04-0062-04
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2025.04.015



正交试验法优选龙骨苦酒汤中桂枝和龙骨煎煮工艺*

罗伟良, 梁晓燕, 肖 娴, 曾荣香[△], 薛敏菲

(广东省佛山市中医院, 广东 佛山 528000)

摘要:目的 优选龙骨苦酒汤中桂枝和龙骨的煎煮工艺。方法 在单因素试验的基础上, 分别以粉碎度、溶剂倍量、煎煮时间为影响因素, 以 Ca^{2+} 提取量为评价指标, 采用 $L_9(3^4)$ 正交试验法优选龙骨煎煮工艺, 并验证; 以优选后的龙骨煎煮工艺煎煮龙骨苦酒汤, 以浸泡时间、煎煮时间、溶剂倍量为影响因素, 以桂皮醛含量为评价指标, 同法优选桂枝煎煮工艺, 并验证。结果 龙骨苦酒汤最优煎煮工艺为, 粉碎龙骨至 60 目, 置 20 倍体积溶剂中煎煮 20 min 后加入已浸泡 30 min 的桂枝继续煎煮 20 min。成品中 Ca^{2+} 平均提取量为 27.56 mg, 桂皮醛平均含量为 1.301 g/L, RSD 均为 0.25% ($n=5$)。结论 优选的工艺操作简便、重复性好, 可为龙骨苦酒汤的煎煮提供参考。

关键词: 龙骨苦酒汤; 桂枝; 龙骨; 正交试验; 煎煮工艺; 工艺优化

Optimization of Decoction Process of Cinnamomi Ramulus and Os Draconis in Longgu Kujiu Decoction by Orthogonal Test

LUO Weiliang, LIANG Xiaoyan, XIAO Xian, ZENG Rongxiang, XUE Minfei

(Foshan Hospital of Traditional Chinese Medicine, Foshan, Guangdong, China 528000)

Abstract: **Objective** To optimize the decoction process of Cinnamomi Ramulus and Os Draconis in Longgu Kujiu Decoction. **Methods** Based on a single factor test, the decoction process of Os Draconis was optimized by the $L_9(3^4)$ orthogonal test with smash degree, solvent amount and decoction time as the influencing factors, and with Ca_2^+ extraction amount as the evaluation indicator, and then the verification test was conducted. Longgu Kujiu Decoction was decocted by the optimal decoction process of Os Draconis, the decoction process of Cinnamomi Ramulus was optimized by the $L_9(3^4)$ orthogonal test with soaking time, decoction time, and solvent amount as influencing factors, and with cinnamaldehyde content as the evaluation indicator, and then the verification test was conducted. **Results** The optimal decoction process of Longgu Kujiu Decoction was as follows: Os Draconis was ground to 60 mesh and decocted in 20 times the amount of water for 20 min, and then the Cinnamomi Ramulus that had been soaked for 30 min was added to continue decoction for another 20 min. The average extraction amount of Ca_2^+ in the finished product was 27.56 mg, the average content of cinnamaldehyde was 1.301 g/L, with RSDs of 0.25% for both ($n=5$). **Conclusion** The optimal process is easy and repeatable, which can provide a reference for the decoction of Longgu Kujiu Decoction. **Key words:** Longgu Kujiu Decoction; Cinnamomi Ramulus; Os Draconis; orthogonal test; decoction process; process optimization

龙骨苦酒汤是黄芪芍药桂枝苦酒汤的加减方, 由龙骨、黄芪、桂枝、白芍等组方, 具有益气祛湿、和营泻热的功效, 常用于治疗慢性肾炎、内分泌紊乱偏于表虚多汗。书中记载以苦酒(醋)200 g、水 1.4 L 相和, 煮取 600 mL, 每次温服 200 mL, 但现今医院多以水代替苦酒煎煮。方中龙骨为矿物类药物, 主要成分为 $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 宜先煎; 桂枝为芳香性药物, 主要成分为桂皮醛, 其易挥发, 在水中溶解度小, 宜后下。本研究中以煎剂中龙骨指标性成分 Ca^{2+} 提取量和桂枝指标性成分桂皮醛含量为考察指标, 以粉碎度、溶剂倍量、煎煮时间、浸泡时间为考察因素, 采用 $L_9(3^4)$ 正交试验优选龙骨苦酒汤中龙骨和桂枝的煎煮工艺。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

KDM 型调温电热套(山东省鄄城永兴仪器厂); DUG-S2474 型电热恒温干燥箱(厦门科睿特仪器公司); ES-J120 型电子分析天平(沈阳龙腾电子称量仪器有限公司, 精度为 0.1 mg); 1260 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司); KQ-800DE 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 试剂

饮片龙骨(批号为 200501)、黄芪(批号为 200321)、桂枝(批号为 200412)、白芍(批号为 200708), 均购自广州至信药业股份有限公司; 桂皮醛对照品(中国食品药

*基金项目: 广东省佛山市自筹经费类科技创新项目[2420001004252]。

第一作者: 罗伟良, 男, 大学本科, 副主任中药师, 研究方向为中药学, (电子信箱)1459026048@qq.com。

[△]通信作者: 曾荣香, 女, 大学本科, 主任中药师, 研究方向为中药学, (电子信箱)okzrx@163.com。

品检定研究院,批号为 110710-202022,含量 $\geq 99\%$);试剂均为分析纯,水为纯化水。

2 方法与结果

2.1 Ca^{2+} 提取量测定

取样品适量,浓缩至 100 mL,置蒸发皿中,在 60 °C 条件下水浴蒸干,干燥至恒重,得浸膏。取浸膏 0.2 g,置锥形瓶中,加 10 mL 稀盐酸溶解,加 100 mL 水与 1 滴甲基红指示剂,加入氢氧化钾试液至显浅黄色,继续滴加 5 mL,加入钙黄绿素指示剂,用乙二胺醋酸二钠滴定液(0.051 1 mol/L)滴定至黄绿色荧光消失并显橙色,计算 Ca^{2+} 提取量。 Ca^{2+} 提取量(mg) = 浸膏中 Ca^{2+} 质量分数(mg/g) $\times$ 出膏率 $\times$ 药材质量(g)。

2.2 桂皮醛含量测定

2.2.1 色谱条件

采用高效液相色谱(HPLC)法。色谱柱:Agilent ZORBAX Eclipse XDB - C₁₈ 柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm),流动相:0.1%磷酸水溶液(A) - 乙腈(B),梯度洗脱(洗脱程序见表 1);流速:1.0 mL/min;检测波长:290 nm;柱温:30 °C;进样量:10 μL 。

表 1 梯度洗脱程序

Tab. 1 Program of gradient elution

时间(min)	流动相B(%)	时间(min)	流动相B(%)
0~15	12 $\rightarrow$ 15	40~48	40 $\rightarrow$ 42
15~22	15 $\rightarrow$ 17	48~49	42 $\rightarrow$ 100
22~27	17 $\rightarrow$ 22	49~53	100
27~40	22 $\rightarrow$ 40	53~56	100 $\rightarrow$ 12

2.2.2 溶液制备

取桂皮醛对照品适量,精密称定,加 50% 甲醇制成每 1 mL 含 19.25 μg 的溶液,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得对照品溶液。按龙骨苦酒汤处方称取饮片,置煎煮机中,煎液趁热滤过后浓缩,冷却,置于 2 000 mL 容量瓶中,加水定容,精密量取 10 mL,置 25 mL 容量瓶中,加入 14 mL 甲醇,超声(功率 300 W,频率 50 kHz)处理 30 min,冷却,加甲醇定容,摇匀,经 0.45 μm 微孔

滤膜滤过,取续滤液,即得供试品溶液。按龙骨苦酒汤处方及工艺制备缺桂枝的阴性样品,按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。

2.2.3 方法学考察

系统适用性试验及专属性试验:分别取 2.2.2 项下 3 种溶液适量,按 2.2.1 项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果理论板数以桂皮醛计为 16 050,各成分分离度大于 2.5,且阴性对照无干扰。详见图 1。

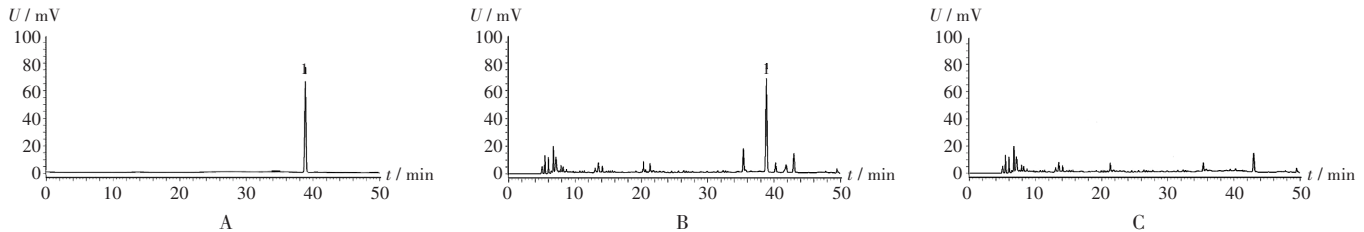
线性关系考察:取对照品溶液适量,逐级稀释,制成系列对照品溶液。精密吸取 10 μL ,按 2.2.1 项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以桂皮醛质量浓度(X , $\mu\text{g/mL}$)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程 $Y = 715.57X + 46.921$ ($r = 0.999\ 3$, $n = 6$)。结果表明,桂皮醛质量浓度在 2.321 ~ 28.742 $\mu\text{g/mL}$ 范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验:精密吸取同一供试品溶液,按 2.2.1 项下色谱条件连续进样 6 次,记录峰面积。结果桂皮醛峰面积的 RSD 为 0.12% ($n = 6$),表明方法精密度良好。

稳定性试验:取 2.2.2 项下供试品溶液适量,分别于室温下放置 0,3,6,9,16,24 h 时按 2.2.1 项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果桂皮醛峰面积的 RSD 为 0.60% ($n = 6$),表明供试品溶液室温放置 24 h 内基本稳定。

重复性试验:精密量取同一批样品适量,按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.2.1 项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算含量。结果桂皮醛平均含量为 1.30 g/L, RSD 为 0.57% ($n = 6$),表明方法重复性良好。

加样回收试验:分别精密移取已知含量的 6 份样品水煎液各 5 mL,分别置 25 mL 容量瓶中,加入等体积对照品溶液并混匀,按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.2.1 项下色谱条件下进样测定,记录峰面积并计算加样回收率。结果桂皮醛的加样回收率为 101.23%, 101.33%, 101.58%, 101.57%, 101.52%, 101.56%, 平



1. 桂皮醛

A. 对照品溶液 B. 供试品溶液 C. 阴性对照品溶液

图 1 高效液相色谱图

1. Cinnamaldehyde

A. Reference solution B. Test solution C. Negative reference solution

Fig. 1 HPLC chromatograms

均 101.47%, RSD 为 0.15% ($n = 6$)。

2.3 单因素试验

粉碎度:取处方饮片各适量,共 4 份,分别将龙骨粉碎至 20, 40, 60, 80 目,充分浸泡后煎煮 40 min,测定煎剂中 Ca^{2+} 提取量。结果分别为 5.761, 7.724, 8.162, 8.315 mg。可见,随着龙骨粉碎度的提高, Ca^{2+} 提取量逐渐增加,故确定龙骨的粉碎度考察条件为 40 ~ 80 目。

溶剂倍量:取处方饮片各适量,共 4 份,分别充分浸泡于 5, 10, 20, 30 倍(体积)水,煎煮 40 min,测定煎剂中 Ca^{2+} 提取量,并测定桂皮醛含量,结果 Ca^{2+} 提取量分别为 8.860, 10.71, 11.32, 13.41 mg; 桂皮醛含量分别为 0.725, 0.971, 0.832, 0.754 mg/L。可见,随着溶剂体积倍量的提高, Ca^{2+} 提取量逐渐增加,而桂皮醛含量先增后减,故确定龙骨苦酒汤的溶剂倍数考察条件为 10 ~ 30 倍。

煎煮时间:取处方饮片各适量,共 4 份,分别充分浸泡后煎煮 10, 20, 30, 40 min,测定煎剂中 Ca^{2+} 提取量及桂皮醛含量,结果 Ca^{2+} 提取量分别为 6.112, 6.340, 6.414, 6.437 mg; 桂皮醛含量分别为 0.813, 1.051, 0.916, 0.825 mg/L。可见,随着煎煮时间的延长, Ca^{2+} 提取量逐渐增加,桂皮醛含量先增后减,故确定龙骨苦酒汤的煎煮时间考察条件为 20 ~ 40 min。

浸泡时间:取处方饮片各适量,共 4 份,分别浸泡 20, 30, 40, 50 min 后煎煮 40 min,测定煎剂中桂皮醛含量,结果分别为 0.703, 0.812, 0.828, 0.834 mg/L。可见,随着浸泡时间的延长,桂皮醛含量逐渐增加,故确定龙骨苦酒汤的浸泡时间考察条件为 30 ~ 50 min。

2.4 正交试验

龙骨煎煮工艺:以粉碎度(A)、溶剂(体积)倍量(B)、煎煮时间(C)为影响因素,以 Ca^{2+} 提取量为评价指标,采用 $L_9(3^4)$ 正交试验法优选龙骨苦酒汤中龙骨煎煮工艺。因素与水平见表 2,正交试验设计与结果见表 3,方差分析结果见表 4。由表 3 和表 4 可知,对煎煮中 Ca^{2+} 溶出具有显著影响的因素为 A 和 B;影响程度由强到弱为 $A > B > C$,方中龙骨最佳煎煮工艺为 $A_2B_2C_3$,即粉碎龙骨至 60 目,置 20 倍体积溶剂中煎煮 40 min。

桂枝煎煮工艺:以龙骨优选的煎煮工艺煎煮龙骨苦酒汤,在单因素试验基础上,以桂皮醛含量为评价指标,以溶剂倍量(A')、煎煮时间(B')、浸泡时间(C')为影

表 2 龙骨煎煮工艺因素与水平

Tab. 2 Factors and their levels of decoction process of Os Draconis

水平	因素 A(目)	因素 B(倍)	因素 C(min)
1	40	10	20
2	60	20	30
3	80	30	40

表 3 龙骨煎煮工艺正交试验设计与结果

Tab. 3 Orthogonal test design and results of decoction process of Os Draconis

序号	A	B	C	D(空白)	Ca^{2+} 提取量(mg)
1	1	1	1	1	14.32
2	1	2	2	2	20.51
3	1	3	3	3	18.54
4	2	1	2	3	19.87
5	2	2	3	1	27.65
6	2	3	1	2	26.25
7	3	1	3	2	18.54
8	3	2	1	3	23.46
9	3	3	2	1	23.63
K_1	53.37	52.73	64.03	65.60	
K_2	73.77	71.62	64.01	65.30	
K_3	65.63	68.42	64.73	61.87	
R	6.80	6.30	0.24	1.24	

表 4 龙骨煎煮工艺方差分析结果

Tab. 4 Results of analysis of variance of decoction process of Os Draconis

方差来源	离差平方和	n	均方	F 值	P
A	70.30	2	35.15	24.55	< 0.05
B	68.14	2	34.07	23.80	< 0.05
C	0.11	2	0.06	0.04	> 0.05
D	2.86	2	1.43	1.00	> 0.05

注: $F_{0.05}(2, 2) = 19.00$, $F_{0.01}(2, 2) = 99.00$ 。表 7 同

Note: $F_{0.05}(2, 2) = 19.00$, $F_{0.01}(2, 2) = 99.00$ (for Tab. 4 and Tab. 7).

响因素,采用 $L_9(3^4)$ 正交试验法优选桂枝煎煮工艺。因素与水平见表 5,正交试验设计与结果见表 6,方差分析结果见表 7。可知,对煎煮中桂皮醛溶出具有显著影响的因素为 B' 和 C';影响程度由强到弱为 $B' > C' > A'$,方中桂枝的最佳煎煮工艺为 $A'_2B'_1C'_1$,即浸泡 30 min 后的桂枝置 20 倍体积溶剂中煎煮 20 min。

表 5 桂枝煎煮工艺因素与水平

Tab. 5 Factors and their levels of decoction process of Cinnamomi Ramulus

水平	因素 A'(倍)	因素 B'(min)	因素 C'(min)
1	10	20	30
2	20	30	40
3	30	40	50

2.5 验证试验

称取龙骨苦酒汤组方药材各适量,平行制备 5 份,按最佳煎煮条件分别煎煮。结果 Ca^{2+} 平均提取量为 27.56 mg,桂皮醛平均含量为 1.301 g/L, RSD 均为 0.25% ($n = 5$)。

表 6 桂枝煎煮工艺正交试验设计与结果

Tab. 6 Orthogonal test design and results of decoction process of Cinnamomi Ramulus

序号	A'	B'	C'	D'	桂皮醛含量(mg/L)
1	1	1	1	1	1.270
2	1	2	2	2	0.754
3	1	3	3	3	0.911
4	2	1	2	3	1.092
5	2	2	3	1	0.932
6	2	3	1	2	1.178
7	3	1	3	2	1.130
8	3	2	1	3	0.941
9	3	3	2	1	0.724
K' ₁	2.94	3.49	3.39	2.93	
K' ₂	3.20	2.63	2.57	3.06	
K' ₃	2.80	2.81	2.97	2.94	
R'	0.14	0.29	0.27	0.05	

表 7 桂枝煎煮工艺方差分析结果

Tab. 7 Results of analysis of variance of decoction process of Cinnamomi Ramulus

方差来源	离差平方和	n	均方	F 值	P
A'	0.03	2	0.01	7.83	> 0.05
B'	0.14	2	0.07	37.99	< 0.05
C'	0.11	2	0.06	30.73	< 0.05
D'	0	2	0	1.00	> 0.05

3 讨论

中药材龙骨属特殊煎煮类药材,矿物类药物,质地坚硬溶解度小,成分难以溶出^[1],故现代中药处方中煎煮时多需先煎^[2],但在历代医药中医药著作中却极少有此要求^[3]。本研究从粉碎度、煎煮时间、用水量方面考察龙骨苦酒汤中Ca²⁺提取量的变化^[4],以确定不同条件对龙骨溶解度的影响。结果显示,粉碎度对龙骨溶解度影响最大^[5],龙骨苦酒汤中Ca²⁺的含量随着龙骨粉碎度的提高逐渐增加。其原理可能是粉碎度的增加增大了有效溶解表面积^[6],但达到饱和时便不再增大,且颗粒越细越易被吸附于药渣中^[7],反而降低药效。桂枝质轻、气味芳香,会持续散失挥发油,煎煮时间对水中桂皮醛含量有明显影响,含量随着煎煮时间呈现先升后降,故不宜久煎。

用水量也是影响龙骨苦酒汤中Ca²⁺提取量的重要因素,由于龙骨溶解度小,用水量增加可增加龙骨中Ca²⁺的提取量^[4],但会降低药物浓度,不利于临床应用和疗效发挥^[8],必须通过煎煮浓缩,通常使用延长煎煮时间或升高温度等方法来减少溶剂^[9],但上述方法均不利于龙骨苦酒汤中桂枝挥发油的溶出,大量散失桂枝挥发油^[10],通过实验研究和权衡利弊,龙骨苦酒汤的合理煎煮用水倍数为20倍。预试验中发现,煎煮次数也会

影响煎剂质量^[11]。研究显示,有效成分的60%,30%分别会在前两煎煎出^[12]。但龙骨作为矿物药材,在水中的溶解度有限^[13],即使经过多次煎煮,煎剂中的Ca²⁺水平平均变化不大^[14],但却可增加龙骨中Ca²⁺的总提取量。桂枝的产地同样影响桂皮醛的含量^[15],桂枝主产于广东、广西、云南等地,其中广西的蛤蟆桂的桂皮醛含量较高,广东的桂枝由于栽培技术不同,桂皮醛含量较低。此外,桂枝为芳香性中药,挥发油会散失,故桂皮醛含量会随着储存时间的延长而减少,同样会对成品测得量产生影响。

综上所述,优选的龙骨、桂枝煎煮工艺操作简便、重复性好,但煎煮次数、煎煮先后顺序等因素和其他药材的煎煮优化工艺尚需进一步探讨,以完善龙骨苦酒汤的煎煮工艺。

参考文献

[1] 陈迪,宋晨,宋杉杉,等. 9批正品龙骨药材的年代测定及年代与成分的相关性分析[J]. 光谱学与光谱分析,2023,43(6):1900-1904.

[2] 朱美云,顾 蓓,陈颖园,等. 中药煎煮之常规与特殊一二[J]. 中医临床研究,2017,9(13):48-49.

[3] 刘桂兰. 浅谈对中药煎煮的认识[J]. 世界最新医学信息文摘,2016,16(32):164-168.

[4] 李丙青,毛淑芳. 抗抑郁症方剂中龙骨牡蛎的提取工艺研究[J]. 广东化工,2017,44(3):32-33.

[5] 聂安政,朱春胜,张 冰. 中药特殊煎法的探讨与思考(一):先煎[J]. 中草药,2018,49(7):1716-1720.

[6] 李建芝. 中药制剂中应用中药细胞级微粉碎技术分析[J]. 河南中医,2016,36(5):906-909.

[7] 曾昭君,鲁 云,刘燎原,等. 丹参药渣资源化利用研究进展[J]. 中国现代中药,2020,22(12):2115-2121.

[8] 周雅亮,罗伟良,吴 利. 羌活细辛汤煎煮工艺优化[J]. 中国药业,2020,29(9):99-101.

[9] 罗伟良,梁晓燕,吴 利. 行气祛瘀汤煎煮工艺研究[J]. 中国药业,2020,29(5):92-95.

[10] 罗伟良,梁晓燕,吴 利. 健脾汤中木香和砂仁药对的煎煮工艺优化[J]. 中国药业,2018,27(5):4-7.

[11] 张立双,江 丰,赵 晨,等. 中药汤剂煎煮法的文献调查分析[J]. 天津中医药,2017,34(6):422-428.

[12] 李俊芳. 影响中药煎剂的质量因素分析[J]. 内蒙古中医药,2015,34(5):82-83.

[13] 李嫣然,陈丽云. 龙骨的本草考证[J]. 辽宁中医药大学学报,2022,24(9):84-87.

[14] 周雅亮,罗伟良,梁丽娟. 正交试验优选解热祛风汤中石膏和荆芥穗煎煮工艺[J]. 中国药业,2021,30(8):21-23.

[15] 于天颖,周劲松,马恩耀,等. 20批不同产地桂枝质量研究[J]. 云南中医中药杂志,2020,41(10):57-62.

(收稿日期:2024-01-16;修回日期:2024-12-28)