

四逆汤煮散工艺研究

朱国雪^{1,2}, 张超², 肖志伟^{1,2}, 乐智勇^{2*}

1. 广东药学院中药学院, 广东 广州 510006

2. 康美(北京)药物研究院有限公司, 北京 102629

摘要: **目的** 在四逆汤组成药材淡附片、干姜、甘草的最佳粒度条件下研究四逆汤的最佳煎煮工艺。**方法** 取各药材的最佳粒度颗粒, 采用 HPLC 法测定四逆汤中甘草酸铵的量, 以紫外分光光度法测定四逆汤中总生物碱的量, 采用单因素实验进行加水量、煎煮时间、煎煮次数等工艺考察, 优选最佳煎煮工艺, 再与其饮片进行对比, 为临床合理使用煮散工艺提供依据。**结果** 四逆汤的最佳煎煮工艺为浸泡 20 min, 加 14 倍量水, 煎煮 30 min, 煎煮 1 次, 且四逆汤煮散在所研究的每个时间点各成分的煎出率都比饮片大而其毒性不大于饮片, 最佳条件下煮散各成分的煎出率也大于常规煎煮条件下的饮片。**结论** 四逆汤煮散工艺具有节省药材、节约时间的优点, 对解决目前中药材缺乏的问题有着不可忽视的作用。

关键词: 煮散; 四逆汤; 最佳粒度; 煎煮工艺; 煎出率

中图分类号: R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2015)10-1470-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.10.012

Research on preparation technology for Sini Boiling Powder

ZHU Guo-xue^{1,2}, ZHANG Chao², XIAO Zhi-wei^{1,2}, LE Zhi-yong²

1. School of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China

2. Beijing Kangmei Pharmaceutical Research Institute Co., Ltd., Beijing 102629, China

Abstract: Objective To optimize the extracting process for Sini Boiling Powder at the condition of optimum particle size. **Methods** The optimum size of particle was prepared, HPLC method was used for the determination of the content of ammonium glycyrrhetate and UV spectrophotometry was used for the determination of the content of total alkaloids. The decoction process was optimized by single factor test with boiling time, amount of water, and boiling times as factors. Then compared with traditional decoction, we can have a basis on clinic. **Results** The optimal conditions of decoction process were soaking 20 min, 14-fold water, boiling 30 min, once. The results showed that both the yield of dry extract and the content of active ingredient at different time points from the boiling powder granule were greatly more than its traditional one during the whole decoction process, and it suggested that Sini Boiling Powder is more safe than Sini traditional decoction. **Conclusion** The advantage of high decoction rate and short preparing time on boiling powder can solve the problems that the traditional Chinese medicine is currently facing and should not be ignored.

Key words: boiling powder; Sini Decoction; optimum size of particle; decoction techniques; decoction rate

四逆汤始载于《伤寒论》, 是东汉名医张仲景之名方, 全方由附子、干姜、炙甘草 3 味药组成, 具有回阳救逆之功效, 主治少阴病如四肢厥逆、下利清谷等症。现代临床观察和药理研究表明, 四逆汤能保护心肌、改善心功能、防止缺血-再灌注的损伤, 特别是对冠心病、心绞痛患者的对症治疗很有效果。

中药煮散是指将中药饮片粉碎成颗粒与水共同

煎煮后, 去渣取汁制成的液体剂型。其不仅具有汤剂吸收快、疗效高的特征, 还能够很好地适应病情的需要、随证加减、提高疗效、节约药材^[1]。

由于四逆汤中主要发挥药效的是附子, 而附子中的主要成分是乌头碱类, 所以总的乌头碱类生物碱一直被作为四逆汤制剂质量控制的重要指标, 且方中甘草对附子的解毒作用有着举足轻重的作用^[2]。

收稿日期: 2014-10-31

基金项目: 北京市科学技术委员会“十病十药”研发项目(Z121102001112010)

作者简介: 朱国雪(1991—), 女, 硕士在读, 中药质量控制研究与物质基础研究。Tel: 18814099571 E-mail: zhuguoxue0122@163.com

*通信作者 乐智勇(1972—), 男, 医学博士, 康美(北京)药物研究院有限公司总经理, 主要从事天然药物有效部位与作用机制研究。
Tel: 18814099571 E-mail: zhuguoxue0122@163.com

且目前并未见有对其煎煮工艺的研究，而本实验以浸膏得率和总生物碱、甘草酸铵的量为指标对四逆汤的煎煮工艺进行考察，再与饮片以及常规煎煮法进行对比，以说明煮散的煎出率高于饮片，从而具备节省药材、节省时间的优点。

1 仪器与材料

Agilent 1100 型高效液相色谱仪、Agilent 8453 型紫外分光光度计，美国 Agilent 公司；KQ-50B 型超声波清洗器，昆山市超声仪器有限公司；TL80-2 型医用离心机，中国姜堰市天力医疗器械有限公司；CPA224s 型电子天平，赛多利斯科学仪器（北京）有限公司；98-I-B 型电子恒温电热套，天津市泰斯特有限公司；SF-B 型包封机，上海三联包装机械有限公司；DFY-300 型万能粉碎机，温岭市林大机械有限公司；WGL-2308 型电热鼓风干燥箱，天津市泰斯特有限公司。

淡附片，广州市药材公司中药饮片厂，批号 YPA3H0001；炙甘草（批号 140481891）、干姜（批号 140581141），康美药业有限公司；经南方医科大学中药鉴定教研室马骥教授鉴定，分别为毛茛科植物乌头 *Aconitum carmichaelii* Debx. 的子根的加工品、豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根和根茎、姜科植物姜 *Zingiber officinale* Rosc. 的干燥根茎。对照品乌头碱（批号 110798-200410，质量分数以 98.6% 计）、甘草酸铵（批号 110731-200511，质量分数以 92.6% 计）均购自中国食品药

品检定研究院。水为液相水，乙腈、甲醇为色谱纯，其他试剂为分析纯，清洁级昆明种小鼠 260 只，安徽医科大学动物中心，合格证号 SCXK（皖）2011-002；体质量 18~25 g，雌雄各半，4~6 周龄。

2 方法与结果

2.1 甘草酸铵的定量测定

2.1.1 对照品溶液的制备 精密吸取甘草酸铵对照品溶液 11.94 mg，用液相用水定容至 25 mL，制成质量浓度为 477.6 μg/mL 的对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液的制备 称取四逆汤饮片，其中淡附片 9 g、甘草 9 g、干姜 6 g，包封，加入 20 倍量水，浸泡 20 min，煎煮 20 min，水煎液浓缩至 50 mL，用 95% 乙醇进行醇沉，放置冰箱内过夜后离心（3 700 r/min，20 min），上清液浓缩至 25 mL，作为供试品溶液。

2.1.3 色谱条件 Agilent Zorbax SB-C₁₈ 色谱柱（250 mm×4.6 mm，5 μm），柱温 30 °C，检测波长 250 nm，体积流量 0.8 mL/min，进样量 5 μL，流动相为乙腈-0.05% 磷酸水溶液，梯度洗脱：0~8 min，19% 乙腈；8~35 min，19%~50% 乙腈；35~36 min，50%~100% 乙腈；36~40 min，100%~19% 乙腈；且甘草酸铵与杂质峰可完全分离，阴性对照样品无干扰（图 1）。理论塔板数按甘草酸铵峰计算，不得低于 5 000，各待测组分峰与相邻成分峰的分度均符合规定。

2.1.4 线性关系考察 取“2.1.1”项下甘草酸铵对

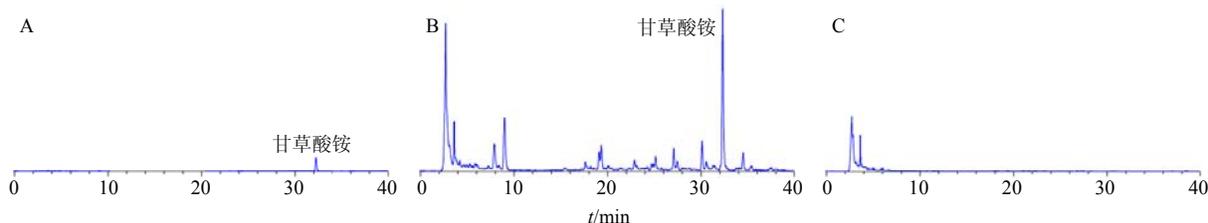


图 1 甘草酸铵对照品 (A)、煮散样品 (B) 和缺甘草的阴性对照样品 (C) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC of monoammonium glycyrrhizinate reference substances (A), boiling powder samples (B), and negative reference substance without *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* (C)

照品溶液 0.5、1、2、3、4、5 mL 于 5 mL 量瓶中，用 80% 甲醇定容至刻度，按“2.1.3”项下色谱条件测定，记录峰面积，以进样量为横坐标 (X)，色谱峰峰面积为纵坐标 (Y)，进行线性回归，结果线性回归方程是 $Y=774.19 X+153.14$ ， $r=0.999 3$ ，线性范围为 0.955 2~9.552 μg。

2.1.5 精密度考察 取甘草酸铵对照品溶液，按“2.1.3”项下色谱条件重复进样 6 次，测定得到甘草

酸铵的色谱峰面积，计算得到 RSD 值为 1.2%，表明仪器精密度良好。

2.1.6 稳定性考察 取同一供试品溶液，分别于制备后 0、2、4、6、8、10、12 h 注入液相色谱仪，计算得到 RSD 值为 1.51%，表明供试品溶液在 12 h 内稳定性良好。

2.1.7 重复性考察 按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液 6 份，按“2.1.3”项下色谱条件测定甘草酸

铵色谱峰峰面积, 计算其 RSD 值为 1.25%, 表明本实验方法重复性良好。

2.1.8 加样回收率试验 精密称定四逆汤煮散 6 份, 分别精密加入甘草酸铵对照品溶液 1 mL, 按“2.1.2”项下方法平行制备 6 份样品, 测定甘草酸铵色谱峰峰面积, 计算得到其平均回收率是 99.01%, RSD 值为 1.82%, 表明本实验方法准确度良好。

2.2 总生物碱定量测定

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取乌头碱对照品适量, 用水溶解, 水定容至刻度, 制成质量浓度为 383.2 $\mu\text{g/mL}$ 的乌头碱对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 参考“2.1.2”项下方法制备供试品溶液, 上清液浓缩至 25 mL。

2.2.3 溴甲酚绿酸性染料制备 精密称取 13.585 5 g 无水乙酸钠粉末, 用 450 mL 的蒸馏水溶解后加入冰醋酸调 pH 值至 6.0 ± 0.1 , 得醋酸-醋酸钠缓冲溶液。称取 207.0 mg 氢氧化钠粉末, 加水定容至 100 mL 量瓶中, 制成 0.05 mol/L 的氢氧化钠溶液。精密称取 201.9 mg 溴甲酚绿粉末, 加入 7 mL 0.05 mol/L 的氢氧化钠溶液, 搅拌混匀加入 450 mL 的醋酸-醋酸钠缓冲溶液, 滤过, 得溴甲酚绿酸性染料^[3]。

2.2.4 乌头碱对照品溶液的染色 精密吸取 1 mL 对照品溶液于分液漏斗中, 加入 8 mL 的氯仿, 再加 2 mL 溴甲酚绿酸性染料, 摇匀, 充分震荡 2 min, 静置 1 h, 取下层溶液, 重复萃取, 合并 2 次的萃取液, 混匀, 定容到 20 mL, 用紫外-可见分光光度计在 410 nm 处测定其吸光度 (A) 值。

2.2.5 线性关系考察 取“2.2.1”项下乌头碱对照品 1、2、3、4、5 mL 于 5 mL 量瓶中, 加水定容至刻度, 用“2.2.4”项下对照品的染色方法进行染色, 记录 A 值, 以对照品的质量浓度 (X) 对 A 值 (Y) 进行线性回归, 得回归方程 $Y=2.0266X-0.0435$, $r=0.9995$, 线性范围 76.64~383.2 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.2.6 精密度考察 取“2.2.1”项下乌头碱对照品 1 mL, 按“2.2.4”项下对照品的染色方法进行染色, 连续测定 5 次, 记录其 A 值, 其 RSD 值是 0.48%, 说明仪器的精密度良好。

2.2.7 重复性考察 称取四逆汤煮散 6 份, 按照“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 然后按“2.2.4”项下方法进行染色, 测定 A 值, 计算得总生物碱质量浓度的 RSD 值为 0.33%, 说明方法重复性良好。

2.2.8 稳定性考察 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.2.4”项下方法进行染色, 分别在 0、

1、2、3、4 h 测定其 A 值, 计算其 RSD 值是 0.38%, 说明样品的稳定性良好。

2.2.9 加样回收率的考察 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 取 9 份样品, 每份 3.3 mL, 用“2.2.1”项下方法制备的乌头碱对照品溶液定容至 5 mL, 按“2.2.4”项下方法进行染色, 记录其 A 值, 计算平均加样回收率为 100.7%, RSD 值为 2.83%, 说明其方法的准确度良好。

2.3 四逆汤煎煮工艺的单因素考察

2.3.1 四逆汤中淡附片、炙甘草、干姜的粒径考察 根据项目中对单味药煮散制备工艺和煎煮工艺的研究得出淡附片优选最粗粉, 而炙甘草和干姜的最粗粉、粗粉、中粉之间无明显差异, 因此从生产、包装、实用全方面考虑, 确定炙甘草的粒度范围 10~80 目占 80%, 大于 10 目和小于 80 目的颗粒不超过 20%, 干姜粒度范围确定为 10~60 目占 80%, 大于 10 目和小于 60 目的颗粒不超过 20%。

2.3.2 四逆汤浸泡时间的考察 称取 15 份四逆汤煮散, 分为 5 组, 每份淡附片 9 g、甘草 9 g、干姜 6 g, 包封, 分别加入 20 倍量水, 分别浸泡 10、20、30、40、50 min, 煎煮 20 min, 定容至 500 mL。按照《中国药典》2010 年版附录 XA 中水溶性浸出物测定法考察浸膏得率, 利用回流提取法, 取供试品适量, 置已干燥至恒质量的蒸发皿中, 在水浴上蒸干后, 于 105 $^{\circ}\text{C}$ 干燥 3 h, 置干燥器中冷却 30 min, 迅速精密称定质量, 计算浸膏得率。剩余水煎液浓缩至 50 mL, 用 95% 乙醇进行醇沉, 放置冰箱内过夜, 上清液离心 (3 700 r/min, 20 min) 后浓缩至 25 mL, 作为供试品溶液。

精密吸取 1 mL 的供试品于分液漏斗中, 加入 8 mL 氯仿、2 mL 溴甲酚绿酸性染料, 摇匀, 充分震荡 2 min, 静置 1 h, 取下层溶液, 再重复萃取, 合并 2 次的萃取液, 混匀, 定容到 20 mL, 用紫外-可见分光光度计测定其 A 值, 并计算总生物碱的量。

取供试品过 0.45 μm 的微孔滤膜, 按“2.1”项下方法测定甘草酸铵的量。结果见表 1。通过方差分析, 浸泡时间对四逆汤中总生物碱、甘草酸铵的煎出量及浸膏得率的影响较小 (方差分析结果 $P>0.05$), 汤剂主要成分的煎出量随煎煮时间的增多未呈现明显上升趋势, 为了节省时间, 因此初步确定四逆汤煮散的浸泡时间为 20 min。

2.3.3 四逆汤加水量的考察 称取 24 份四逆汤煮散, 分为 8 组, 每份淡附片 9 g、甘草 9 g、干姜 6 g,

表1 四逆汤浸泡时间考察结果

浸泡时间/min	浸膏得率/%	总生物碱/ (mg·g ⁻¹)	甘草酸铵/ (mg·g ⁻¹)
10	21.14	7.78	4.86
20	23.21	9.02	6.42
30	23.32	10.03	6.71
40	23.43	10.12	6.87
50	23.49	10.14	6.91

包封, 分别加入 6、8、10、12、14、16、18、20 倍量的水, 浸泡 20 min, 煎煮 20 min, 定容至 500 mL。按照“2.3.2”项下的浸膏得率、总生物碱、甘草酸铵的测定方法来测定, 结果见表 2。通过方差分析, 加水量对四逆汤中总生物碱、甘草酸铵的煎出量及浸膏得率有显著影响 ($P < 0.05$), 进而用多重比较方法 LSD, 进行两两比较, 结果表明, 综合指标性成分量和浸膏得率初步确定四逆汤的加水量为 14 倍。

2.3.4 四逆汤煎煮时间的考察及其与饮片的对比 称取四逆汤煮散 18 份, 分为 6 组, 每份淡附片 9 g、甘草 9 g、干姜 6 g, 包封, 各加入 14 倍量的水, 浸

表2 四逆汤加水量的考察结果

加水量/倍	浸膏得率/%	总生物碱/ (mg·g ⁻¹)	甘草酸铵/ (mg·g ⁻¹)
6	22.44	8.78	5.86
8	24.18	10.02	6.42
10	25.23	11.13	8.01
12	26.99	11.72	8.98
14	28.25	13.54	9.81
16	27.89	10.43	9.57
18	28.03	11.61	9.78
20	28.26	12.44	10.29

泡 20 min, 分别煎煮 10、20、30、40、50、60 min 后, 按照“2.3.2”项下的浸膏得率、总生物碱及甘草酸铵的测定方法来测定。其饮片采用与煮散相同的考察方法来测定, 然后对煮散与饮片在每个时间点进行对比, 其结果见表 3。通过方差分析, 煎煮时间对四逆汤中总生物碱、甘草酸铵的煎出量及浸膏得率有显著影响 ($P < 0.05$), 进而用多重比较方法 LSD, 进行两两比较, 结果表明综合指标性成分和浸膏得率初步确定四逆汤的煎煮时间是 30 min。

表3 四逆汤煎煮时间的考察及其与饮片的对比

Table 3 Decoction time and comparison between traditional decoction and pieces

煎煮时间/min	煮散			饮片		
	浸膏得率/%	总生物碱/(mg·g ⁻¹)	甘草酸铵/(mg·g ⁻¹)	浸膏得率/%	总生物碱/(mg·g ⁻¹)	甘草酸铵/(mg·g ⁻¹)
10	25.84	12.37	4.39	18.68	8.46	1.52
20	28.39	13.65	4.40	19.98	10.86	1.60
30	29.34	14.14	4.64	21.18	11.21	2.57
40	29.61	14.17	4.66	23.23	11.56	2.72
50	30.07	14.18	5.01	24.89	11.80	1.30
60	30.87	14.29	4.90	25.00	11.67	0.77

2.3.5 四逆汤煎煮次数的考察 称取 9 份四逆汤煮散, 分为 3 组, 每份淡附片 9 g、甘草 9 g、干姜 6 g, 包封, 浸泡 20 min, 煎煮 30 min, 不同组别间分别加 6+6 倍量水、8+8 倍量水、10+10 倍量水 (为了考察在相同加水量的时候其指标性成分的变化, 在 6、8、10 倍时, 煎煮 2 次时加水量总共是 12、16、20 倍, 跟之前也有相同的加水量, 因此选择此加水量), 煎煮 2 次, 按“2.3.2”项下的浸膏得率、总生物碱、甘草酸铵的测定方法来测定。比较煎煮 1 次及 2 次的实验数据结果, 综合分析, 优选最佳

煎煮次数, 结果见表 4。

实验结果表明, 煎煮次数对煮散组分的溶出有一定影响, 主要成分的煎出量随煎煮次数的增加而增多, 但考虑到节约能源, 而 1 次煎煮在加入足量水后有效成分的转移率已达 60%~80%, 故初步确定煎煮次数为 1 次。

2.4 煮散与饮片的化学对比研究

以固形物及主要有效成分煎出率为评价指标, 对煮散及饮片进行化学对比性研究。煮散煎煮: 浸泡 20 min, 加 14 倍量水, 煎煮 30 min, 煎煮 1 次。

表 4 四逆汤煎煮次数考察结果

Table 4 Results of times decoction for Sini Decoction

煎煮次数	加水量/倍	浸膏得率/%	总生物碱/(mg·g ⁻¹)	甘草酸铵/(mg·g ⁻¹)
1	6	22.44	8.78	5.86
	8	24.18	10.02	6.41
	10	25.13	11.13	8.01
2	6	31.04	13.13	8.93
	8	38.83	14.62	10.78
	10	40.41	15.65	10.63

饮片煎煮：①同煮散煎煮方法；②常规煎煮方法：浸泡 20 min，加 6 倍量水，煎煮 30 min，煎煮 2 次。结果见表 5。可知，无论是从浸膏得率还是指标性成分来看，四逆汤煮散的有效成分煎出率均比饮片高，且煎煮时间也有所缩短。这也证实了四逆汤煮散具有节约药材、缩短煎煮时间的优点。

2.5 四逆汤煎煮工艺的正交试验

在单因素试验基础上，考察浸泡时间 (A)、加水量 (B)、煎煮时间 (C)、煎煮次数 (D) 对各成分煎出率与浸膏质量的影响，每种因素考察 3 水平。由以上单因素试验结果再进行正交试验，各因素考

表 5 四逆汤煮散和饮片有效成分的对比

Table 5 Comparison of Sini Boiling Powder and pieces

煎煮方式	质量分数/(mg·g ⁻¹)		
	固形物	甘草酸铵	总生物碱
煮散煎煮	293.4	4.64	14.14
饮片煎煮 (同煮散煎煮方法)	211.8	2.57	11.21
饮片煎煮 (常规煎煮)	253.6	2.56	9.75

察水平定为浸泡时间 10、20、30 min，加水量 12、14、16 倍，煎煮时间 20、30、40 min、煎煮次数 1、2、3 次。按照 L₉(3⁴) 正交表进行试验，探讨最佳煎煮工艺。因素水平及正交试验结果见表 6，直观分析结果见表 7，方差分析结果见表 8。由表 8 可知，各因素对总生物碱量的影响大小是 B>C>D>A，且最佳煎煮工艺是 A₂B₂C₃D₂；各因素对甘草酸铵的影响大小是 C>B>D>A，且最佳煎煮工艺是 A₃B₂C₂D₂；各因素对浸膏得率的影响大小是 B>A>C>D，且最佳煎煮工艺是 A₂B₂C₂D₂。

综合各项指标，通过以上正交试验得到的最佳煎煮工艺为 A₂B₂C₂D₂；由于 D₁ 和 D₂ 组数据相差不

表 6 L₉(3⁴) 正交试验设计及结果

Table 6 Design and results of L₉(3⁴) orthogonal test

试验号	A/min	B/倍	C/min	D/次	浸膏得率/%	总生物碱/(mg·g ⁻¹)	甘草酸铵/(mg·g ⁻¹)
1	10 (1)	12 (1)	20 (1)	1 (1)	20.08	8.51	8.05
2	20 (2)	14 (2)	30 (2)	2 (2)	27.89	14.75	12.98
3	30 (3)	16 (3)	40 (3)	3 (3)	25.57	14.13	11.71
4	10 (1)	12 (1)	30 (2)	3 (3)	24.90	9.56	11.69
5	20 (2)	14 (2)	40 (3)	1 (1)	29.78	15.09	12.78
6	30 (3)	16 (3)	20 (1)	2 (2)	27.89	13.38	8.65
7	10 (1)	12 (1)	30 (2)	2 (2)	24.81	10.12	12.07
8	20 (2)	14 (2)	20 (1)	3 (3)	26.97	12.74	8.98
9	30 (3)	16 (3)	40 (3)	1 (1)	29.96	14.42	12.67

表 7 直观分析

Table 7 Analysis of intuition

水平	总生物碱/(mg·g ⁻¹)				甘草酸铵/(mg·g ⁻¹)				浸膏得率/%			
	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D
K ₁	37.39	28.19	34.63	38.02	32.74	31.81	25.68	33.50	73.54	69.79	74.94	79.82
K ₂	38.03	42.58	38.73	38.25	33.12	34.74	37.34	33.70	82.57	84.64	82.75	80.59
K ₃	37.28	41.93	39.34	36.43	33.72	33.03	36.56	32.38	81.74	83.42	80.16	77.44
R	0.25	4.80	1.57	0.61	0.33	0.98	3.89	0.44	3.01	4.95	2.60	1.05

表8 方差分析

Table 8 Analysis of variance

方差来源	自由度	总生物碱			甘草酸铵			浸膏得率		
		离差平方和	F值	显著性	离差平方和	F值	显著性	离差平方和	F值	显著性
A	2	0.11	0.17		0.16	0.48		16.61	9.24	
B	2	44.03	67.24	$P<0.05$	1.44	4.28		45.31	25.20	$P<0.05$
C	2	4.37	6.68		28.33	83.95	$P<0.05$	10.55	5.87	
D	2	0.65	1.00		0.34	1.00		1.80	1.00	

$F_{0.05}(1, 2) = 19.00$ $F_{0.01}(1, 2) = 99.00$

大，但是煎煮1次和煎煮2次能耗相差很大，所以还是选择了D₁，即浸泡时间20 min，加水量是14倍，煎煮时间30 min，煎煮1次。验证实验结果见表9。

表9 验证试验

Table 9 Test of verification

批次	浸膏得率/%	总生物碱/(mg·g ⁻¹)	甘草酸铵/(mg·g ⁻¹)
1	28.98	14.88	12.67
2	29.01	15.03	12.98
3	29.32	14.76	13.01

3 四逆汤煮散与饮片的急性毒性实验

3.1 四逆汤煮散与饮片的水煎液的制备

取四逆汤处方中药材煮散最佳颗粒，按处方称取480 g，浸泡20 min，加14倍量水，煎煮30 min，煎煮1次，制备水煎液，最后浓缩至质量浓度为4 g/mL。饮片的水煎液的制备方法与煮散相同。均作为供试品备用。

3.2 预试验

取小鼠实验前禁食不禁水12 h，按体质量随机分为6组，每组10只，给药组按0.8~4 g/mL，以0.85 g/mL的质量浓度为梯度ig 1次，以水为对照组ig 给药，观察动物给药后的反应及死亡情况，分别计算煮散和饮片的半数致死量(LD₅₀)，比较二者毒性的大小^[3]。预试验结果表明，在以上质量浓度梯度下动物均未出现死亡现象，且4 g/mL已是四逆汤可以浓缩的最大质量浓度，因此难以测出LD₅₀，改为最大耐受量(MTD)或者最大给药量测定。

3.3 急性毒性实验

取小鼠120只，按体质量和性别随机分为3组，蒸馏水对照组、煮散剂量组和饮片剂量组，实验前禁食不禁水12 h。药物组按0.4 mL/10 g的最大给药量(4 g/mL)进行ig 给药，空白对照组给予同等剂

量的蒸馏水，观察小鼠的死亡、中毒及活动情况，并记录小鼠的体质量、饮食变化，观察时间为14 d。从而比较两者毒性大小。

观察指标：(1)行为及反应(包括不正常叫声、烦躁、不安等)；(2)运动(包括肌肉抽搐、僵硬、强迫运动等)；(3)瞳孔及分泌物(瞳孔有无缩小或放大、流泪等)。呼吸及心血管：呼吸急促或过缓、鼻分泌、触心前区心率快慢等。胃肠方面：腹部胀气或收缩、大便坚硬或湿等。泌尿生殖系统：阴唇、乳腺肿胀，会阴部肮脏。皮肤和毛：颜色、完整性、有否充血、发疹等。眼：眼睑下垂、眼球突出、震颤等^[4]。

3.4 实验结果

四逆汤煮散和饮片组给药后，小鼠无死亡现象出现，但除蒸馏水对照组外均不同程度表现出易烦躁激怒、打架现象，部分小鼠尾部被咬出血，以四逆汤饮片组雄性更为明显。部分小鼠在给药后0.5 h出现轻度呼吸急促。无明显消化系统异常，只是在给药24 h内小鼠粪便为黑色较黏稠软便，形态似药物，后续13 d观察则恢复正常。

四逆汤饮片和煮散对昆明种小鼠的最大给药量均为320 g/kg。且给药24 h内四逆汤饮片组的小鼠出现的不良现象较为明显，说明四逆汤煮散的毒性不大于四逆汤饮片的毒性。

4 讨论

本实验通过对四逆汤药材粉碎，对其加水量、煎煮时间、煎煮次数、对饮片和煮散的对比进行考察，四逆汤的最佳煎煮工艺是14倍量水，浸泡20 min，煎煮30 min，煎煮1次，且在煮散最优条件下，煮散的各成分煎出量是饮片的1.26~1.81倍，煮散各成分煎出量是常规煎煮的1.45~1.81倍。而且煎煮时间大大缩短，工艺简单，而且其煮散的毒性并不比饮片的毒性高。

由于粒径会影响煎出率^[5], 因为炙甘草、干姜的纤维性强, 本实验选择其粉体的时候不仅应该考虑其煎出率, 还应该考虑其生产的可能性。

本实验在煎煮次数考察时, 只选择了煎煮1次与2次的考察, 每次只有加水量6+6倍、8+8倍、10+10倍水, 是考虑到要和前面对比其加水量要一致, 且考虑到加水量过多时, 为达到临床汤剂服用量会相应增加浓缩时间, 从而增加消耗^[6], 在实验结果中煎煮1次各成分的煎出率已经可以达到煎煮2次的85%以上, 因此选择了煎煮1次, 后面的正交试验也验证了此单因素考察的结果。

煮散既可以保持中药共煎过程, 实现药物与药物之间相互作用, 又能够节省药源, 节约煎煮时间且具有调配方便的特点。其颗粒度介于饮片与超微粉之间, 对其进行全面完善的研究, 可以填补中药在颗粒度方面的空缺。而本实验证实了四逆汤煮散的省材省时之优点, 这也为煮散的进一步研究提供

了参考, 同时为中药传统饮片应用形式的创新提供了新思路, 值得推广^[10]。

参考文献

- [1] 穆兰澄, 曹京梅, 李冀湘, 等. 中药煮散的历史沿革与现代研究概述 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2008, 14(7): 74-75.
- [2] 晏亦林, 周莉玲, 李 锐. 四逆汤中乌头类生物碱的研究进展 [J]. 时珍国医国药, 2001, 12(8): 732-733.
- [3] 杨玉琴, 梁光义, 秦利芬, 等. 3种剂型四逆汤中总生物碱的含量研究 [J]. 安徽农业科学, 2011, 39(30): 18526-18527.
- [4] 李晓骄阳, 栾永福, 孙 蓉. 附子不同组分对正常小鼠的急性毒性实验比较研究 [J]. 中国药物警戒, 2013, 10(10): 583-587.
- [5] 郭 峰. “中药煮散”与饮片、超微粉不同粒度煎出率对比研究 [J]. 内蒙古中医药, 2013, 32(9): 94.
- [6] 吴伟康, 奉建芳, 黄小蕊, 等. 甘草提取工艺的初步研究 [J]. 中草药, 2001, 32(3): 210-212.