

## 正交试验优选龙胆炮制工艺的研究

廖梅香<sup>1</sup>, 薛玉洁<sup>2</sup>

(1. 赣南医学院药学院, 江西赣州 341000; 2. 赣南医学院 2015 级中药学专业, 江西赣州 341000)

**摘要** [目的]比较龙胆生品、酒炙、姜炙、甘草炙、炒炭等不同炮制品中龙胆苦苷的含量,并利用正交试验进一步优化其炮制工艺,探讨提高龙胆苦苷含量的最佳炮制工艺。[方法]分别对龙胆药材进行不同的炮制处理,采用超声法进行提取,利用高效液相色谱法(HPLC)分别测定其含量,选择龙胆苦苷含量最高的样品进行正交试验,进一步优化炮制工艺。[结果]龙胆不同炮制品中酒炙龙胆的含量高于其他炮制品。当炮制温度为 100 ℃,闷润时间为 1 h,龙胆与黄酒用量比例为 5:1 时,龙胆苦苷含量最高。[结论]酒炙法是适用于龙胆的炮制方法,且最适宜的炮制条件为炮制温度 100 ℃、闷润时间 1 h、龙胆与黄酒用量比例 5:1。

**关键词** 龙胆苦苷;高效液相色谱法;超声提取法;正交试验

中图分类号 R 283 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2020)08-0182-03

doi:10.3969/j.issn.0517-6611.2020.08.044



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

## Study on Optimization of the Processing Technology of Gentiana by Orthogonal Experiment

LIAO Mei-xiang<sup>1</sup>, XUE Yu-jie<sup>2</sup> (1. School of Pharmacy, Gannan Medical College, Ganzhou, Jiangxi 341000; 2. Grade 2015 of Chinese Pharmacy Specialty, Gannan Medical College, Ganzhou, Jiangxi 341000)

**Abstract** [Objective] To compare the content of gentiopicroside from *Gentiana scabra* Bge. in different processing technology such as the crude, carbonized products, and stir-frying with wine, ginger, glycyrrhiza products, further discuss and analyze the best processing method for increasing the content of gentiopicroside. [Method] HPLC method was applied to determine the content of gentiopicroside with ultrasonic extraction from different processed products. By comparison and analysis, the orthogonal test was carried out on the product with the highest content to optimize processing technology. [Result] In different processing products, the content of gentiopicroside in stir-frying with wine products was higher than other products, and the content was highest when the temperature was 100 ℃, the moist time was 1 h, the proportion of *G. scabra* Bge. and wine was 5:1. [Conclusion] The optimum method to process *G. scabra* Bge. was stir-frying with wine, and the concrete conditions were as follows: temperature was 100 ℃, the moist time was 1 h, the proportion of *G. scabra* Bge. and wine was 5:1.

**Key words** Gentiopicroside; HPLC; Ultrasonic extraction method; Orthogonal test

龙胆为龙胆科植物条叶龙胆(*Gentiana manshurica* Kitag.)、三花龙胆(*Gentiana triflora* PalL)或坚龙胆(*Gewhawa rigescens* Franch.)的干燥根和根茎,苦、寒,具有清热燥湿、泄肝胆火之功效<sup>[1]</sup>。龙胆的主要化学成分为龙胆苦苷,具有护肝、镇痛、利胆、抗菌抗病毒等作用<sup>[2]</sup>。

龙胆传统的炮制方法有酒炒、炒炭、蜜炙等<sup>[3]</sup>。大多是通过经验进行炮制,定量分析报道较少<sup>[4]</sup>。笔者通过比较龙胆不同的炮制品,确定龙胆苦苷含量最高的一种炮制方法,进一步进行正交试验,以龙胆苦苷为指标,采用高效液相色谱法对炮制工艺的主要影响因素进行考察,筛选出最佳炮制工艺,使龙胆炮制品更好地发挥临床效果,以期龙胆药材炮制方法的选择提供更多的参考。

## 1 材料与方法

## 1.1 仪器、药材与试剂

**1.1.1 仪器。**高效液相色谱仪(日本岛津,SPD-15C);超声仪(KQ-500DB,昆山市超声仪器有限公司);分析天平(十万分之一,Quintix 125D-1CN,赛多利斯公司);真空干燥箱(DZF-6050,上海一恒科学仪器有限公司)。

**1.1.2 药材。**龙胆生品由江西省仁和药业有限公司购入,经赣南医学院药学院生药学教研室老师鉴定,确定为龙胆科植物龙胆(*Gentiana scabra* Bge.)的干燥根茎。

**1.1.3 试剂。**甲醇,分析纯、色谱纯(广西西陇科学股份有限公司)龙胆苦苷对照品(规格 20 mg,批号为 110256-201815,购自中国食品药品检定研究所)。

## 1.2 试验方法

**1.2.1 龙胆的不同炮制品考察。**炮制生品龙胆、酒炙龙胆、炒炭龙胆、姜炙龙胆、甘草炙龙胆,分别粉碎过 40 目筛,放置干燥箱中备用。

**1.2.2 酒炙龙胆单因素考察。**取龙胆饮片 100 g 5 份,分别于炮制温度(60、80、100、130、160、180 ℃)、闷润时间(0.5、1.0、2.0、3.0、4.0 h)、龙胆与黄酒用量比例(3:1、5:1、10:1、15:1、20:1)条件下进行炮制,放冷,粉碎后过 40 目筛备用,测定龙胆苦苷的含量。

**1.2.3 龙胆苦苷含量的测定。**

**1.2.3.1 对照品溶液的配制。**精密称取龙胆苦苷对照品 9.45 mg,置于 100 mL 棕色量瓶中,加入甲醇溶液稀释并定容成每 1 mL 含 0.945 mg 的溶液。注意避光保存,备用。

**1.2.3.2 HPLC 色谱条件。**色谱柱为 C<sub>18</sub>(4.6 mm×150 mm, 5 μm);流动相 A 为水,流动相 B 为甲醇(水:甲醇=75:25);流速 1 mL;检测波长 270 nm;柱温箱温度 30 ℃;进样量 20 μL(进样前样品用微孔滤膜过滤)。

**1.2.3.3 供试样品溶液的配制。**取各炮制品试样粉末(过 4 号筛)约 0.5 g,精密称定后,置于 50 mL 具塞锥形瓶中,加入甲醇 20 mL,称定重量,40 ℃ 超声(400 W, 45 kHz)提取 30 min,放冷,再称定重量,用甲醇补足减失的重量,摇匀,滤过,滤液备用;取续滤液经 0.45 μm 微孔滤膜过滤后作为供试品溶液,注意避光保存,备用。

**基金项目** 江西省中医药课题(2016A054);江西省教育厅课题(GTT180817)。

**作者简介** 廖梅香(1984—),女,江西吉安人,实验师,硕士,从事中药成分分析研究。

**收稿日期** 2019-09-10; **修回日期** 2019-09-23

**1.2.3.4 线性关系的考察。**精密吸取“1.2.3.1”中的龙胆苦苷对照品溶液 0.2、0.5、1、2、5、10 mL 分别置于 10 mL 的棕色容量瓶中,用甲醇定容后,摇匀,经 0.45  $\mu\text{m}$  微孔滤膜过滤后作为各浓度的对照品溶液。按照“1.2.3.2”中的色谱条件测定,以浓度( $X$ )为横坐标,以龙胆苦苷峰面积( $Y$ )为纵坐标,绘制标准曲线,得到回归方程  $Y=2\times 10^7 X+45\ 630$  ( $R^2=0.999\ 7$ ),龙胆苦苷在 0.004~0.189 mg/mL 内线性关系良好。

**1.2.3.5 精密度试验。**精密吸取龙胆苦苷对照品溶液 20  $\mu\text{L}$  连续进样 6 次,测定龙胆苦苷峰面积的相对标准偏差(RSD)为 1.03%。

**1.2.3.6 稳定性试验。**精密吸取供试品溶液 20  $\mu\text{L}$ ,分别于 0、2、4、8、12、24 h 后按上述色谱条件进样,测得龙胆苦苷峰面积的 RSD 为 1.37%。

**1.2.3.7 重复性试验。**取龙胆样品 6 份,按照“1.2.3”方法配制供试溶液,按照色谱条件连续进样 6 次,测得龙胆苦苷峰面积的 RSD 为 1.05%。

**1.2.3.8 加样回收率试验。**取已知含量的龙胆生品 6 份,每份 0.2 g,精密称定,置于 10 mL 棕色容量瓶中,分别加入质量浓度为 0.189 mg/mL 的龙胆苦苷对照品溶液 5.0 mL,加甲醇定容稀释至刻度,按照色谱条件测定,计算平均回收率,得到 RSD 为 1.19%。

**1.2.4 龙胆苦苷含量测定。**按“1.2.3.3”方法制备供试品溶液,按照“1.2.3.2”色谱条件进行测定,根据“1.2.3.4”中的回归方程计算龙胆苦苷的含量。

**1.2.5 炮制工艺条件的优化。**采用不同炮制方法炮制样品,

测定龙胆苦苷含量,选出其中龙胆苦苷含量最高的供试品炮制方法。中医认为,酒炒上行能矫其苦涩大寒的本性,用于虚弱病人则酒炒炭<sup>[5]</sup>。目前,酒制龙胆在临床上仍被广泛应用,且甘草炙龙胆工艺繁琐<sup>[6]</sup>,故多选择酒炙龙胆,采用正交试验设计探讨酒炙龙胆的最佳炮制工艺。

参照全国炮制规范中酒制龙胆的炮制方法<sup>[7]</sup>,通过单因素考察结果,选取影响较大的因素,采用正交试验法进行工艺优化,选择炮制温度(A)、闷润时间(B)、龙胆与黄酒用量比例(C)3个因素,考察指标为龙胆苦苷含量,采用  $L_9(3^4)$  正交试验表进行正交试验。正交试验因素与水平设计见表 1。

表 1 正交试验因素与水平设计

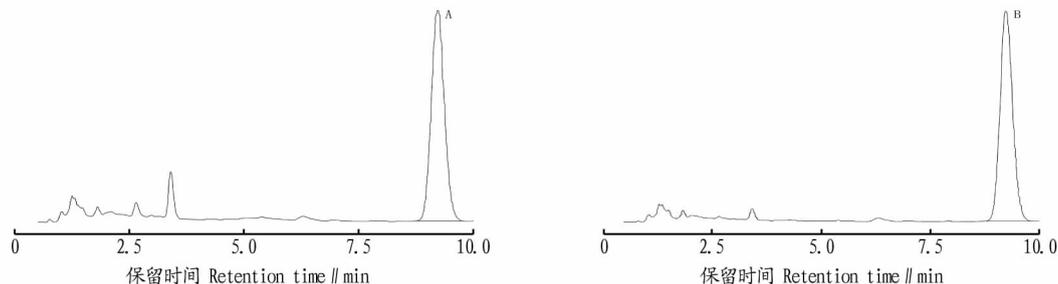
Table 1 Factor and level design of orthogonal test

水平 Level	因素 Factor		
	(A) 炮制温度 Processing temperature// $^{\circ}\text{C}$	(B) 闷润时间 Stuffy time h	(C) 龙胆与黄酒用量比例(g:g) Proportion of Gentiana to yellow rice wine
1	100	1	5:1
2	130	2	10:1
3	160	3	15:1

按正交试验表进行试验,每次试验重复 2 次,取龙胆 30 g,均匀喷洒不同用量的黄酒(C),充分拌匀,密闭闷润不同时间(B),取出后置于不同温度(A)下炒制,炒干后取出,放冷。取样测定,计算龙胆苦苷含量。

## 2 结果与分析

龙胆样品及对照品溶液色谱图见图 1。



注:A.龙胆苦苷对照品;B.龙胆炮制样品

Note:A.Reference substance of gentiopicroside;B. Processed samples of gentiopicroside

图 1 龙胆苦苷 HPLC

Fig.1 HPLC of gentiopicroside

正交试验结果见表 2。

方差分析结果表明,影响龙胆苦苷含量的因素从主到次依次为炮制温度(A)、闷润时间(B)、龙胆与黄酒用量比例(C)。最佳炮制工艺为  $A_1B_1C_3$ ,但出于对炮炙成本的综合考量, $A_1B_1C_1$  的炮制工艺更适合用于生产中,即龙胆与黄酒用量比例为 5:1,闷润 1 h 后再在 100  $^{\circ}\text{C}$  下炮制。

按照上述优选的最佳炮制工艺分别炮制龙胆 3 次,编号为样品 1、样品 2、样品 3,配制供试品溶液,并按照“1.2.3.2”中规定的色谱条件测定龙胆苦苷含量,分别为 0.045 1、0.039 8、0.041 7 mg/mL。

## 3 讨论与结论

该试验首先在生品龙胆、酒炙龙胆、姜炙龙胆、炒炭龙

胆、甘草炙龙胆中利用高效液相色谱法分别测定其龙胆苦苷含量,结果表明甘草炙龙胆与酒炙龙胆含量相当且高于其他炮制样品。综合考虑文献资料、试验操作复杂程度和耗费时间<sup>[8-10]</sup>,选择对酒炙龙胆进行进一步正交试验。通过单因素试验确定炮制温度、闷润时间、黄酒与龙胆用量比例 3 个因素对龙胆苦苷含量的影响。根据  $L_9(3^4)$  正交设计试验表进行炮制处理,制成供试品溶液,采用高效液相色谱法进行龙胆苦苷含量测定。结果表明,这 3 种因素对龙胆苦苷含量的影响均不显著,其中影响较大的是炮制温度。正交试验结果表明,酒炙龙胆的最佳炮制工艺如下:炮制温度 100  $^{\circ}\text{C}$ 、闷润时间 1 h、龙胆与黄酒用量比例为 5:1。

表2  $L_9(3^4)$  正交试验结果Table 2 The results of  $L_9(3^4)$  orthogonal experiment

组别 No.	A	B	C	空白 Blank	龙胆苦苷含量 Gentiopicroside content // mg/mL
1	1	1	1	1	0.043 2
2	1	2	2	2	0.031 6
3	1	3	3	3	0.036 0
4	2	1	2	3	0.029 5
5	2	2	3	1	0.026 3
6	2	3	1	2	0.013 6
7	3	1	3	2	0.021 6
8	3	2	1	3	0.014 2
9	3	3	2	1	0.016 8
$k_1$	0.037	0.031	0.024	0.029	
$k_2$	0.023	0.024	0.026	0.022	
$k_3$	0.018	0.022	0.028	0.027	
R	0.019	0.009	0.004	0.007	

该试验比较了龙胆生品、酒炙法、姜炙法、炒炭法、甘草炙法,从而进一步验证了龙胆的传统炮制方法是酒炙法。选

(上接第 181 页)

#### 4 结论

通过改变晒红烟的调制方式可以显著改变烟叶中烟碱、总糖以及挥发碱的含量。在调制工艺中,需注重烟叶前期变黄阶段,该过程的调制是使烟叶烟碱含量增加,总糖及挥发碱含量降低的主要过程。根据口含烟生产的需求,初步认为棚内封闭晾制烟叶的烟碱含量高于 4.5%、总糖含量低于 2% 且挥发碱含量较低。因此,棚内封闭晾制的调制方式,可用于调制口含烟生产所需要的晒红烟。具体调制方式如下:先用绳索捆扎烟叶叶柄后,上架于遮阴棚内(棚的四周用塑料薄膜围起来)在棚内将烟叶晾干。

另外,基于晒红烟原料的棚内晒制工艺最适宜的温湿度以及相同调制工艺下烟叶不同成分之间的相关关系还有待进一步研究。

#### 参考文献

[1] 窦玉青,沈轶,张继旭,等.口含烟发展现状及原料研究进展[J].贵州农业科学,2016,44(12):133-136.

取龙胆苦苷含量为酒炙龙胆工艺优化的考察指标还有些单一,而关于酒炙龙胆的炮制机制还有待于进一步研究。

#### 参考文献

[1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典(2015版一部)[S].北京:中国医药科技出版社,2015:96.  
 [2] 陈雷,王海波,孙晓丽,等.龙胆苦苷镇痛抗炎药理作用研究[J].天然产物研究与开发,2008,20(5):903-906.  
 [3] 孙紫薇,陈丽,辛宇,等.酒炙龙胆炮制工艺研究[J].人参研究,2017(6):48-50.  
 [4] 董小蕾,张霁,赵艳丽,等.龙胆炮制前后化学成分变化的比较研究[J].药物分析杂志,2015,35(4):620-626.  
 [5] 张楠,姜雨昕,任悦,等.龙胆及朝鲜龙胆中龙胆多糖与龙胆苦苷的含量测定[J].时珍国医国药,2016,27(10):2395-2397.  
 [6] 徐宏亮,刘玉强,才谦.酒制前后龙胆中龙胆苦苷和獐牙菜苦苷的含量变化研究[J].中成药,2009,31(8):1237-1239.  
 [7] 中华人民共和国药政管理局.全国中药炮制规范[M].北京:人民卫生出版社,1988:78.  
 [8] 王彩君,王智民,王维皓,等.酒制龙胆的最佳炮制工艺研究[J].中国中药杂志,2008,33(20):2335-2338.  
 [9] 张涛.龙胆及其炮制品中龙胆苦甙的含量比较[J].中药材,2000,23(7):387-389.  
 [10] 李小芳,黄毅,蒋卫,等.正交实验设计优选酒炙龙胆的最佳炮制条件[J].中成药,2006,28(3):370-371.

[2] EVENS G.The old snuff house of Fribourg & Treyer at the sign of the rasp & crown [M].London: Nabu Press, 2010.  
 [3] 中国农业科学院烟草研究所.中国烟草栽培学[M].上海:上海科学技术出版社,2005.  
 [4] 徐佳宏.浙江优质特色烟叶的可持续发展研究:以桐乡晒红烟为例[J].农村经济与科技,2012,23(3):102-104.  
 [5] 闫克玉,赵铭钦.烟草原科学[M].北京:科学出版社,2008.  
 [6] 程向红.晒红烟在中式低焦油卷烟中的应用[J].农产品加工(学刊),2011(10):63-65.  
 [7] 韩富根.烟草化学[M].北京:中国农业出版社,2010.  
 [8] ENVIRON International Corporation.Review of the scientific literature on snus(Swedish moist snuff)[EB/OL].(2010-03-31)[2019-05-20].http://www.docin.com/p-1928373818.html.  
 [9] 宫长荣.烟草调制学[M].北京:中国农业出版社,2003.  
 [10] 朴世领,李虎林,李云善,等.晒红烟调制时期烟叶化学成分的变化规律研究[J].延边农学院学报,1995,17(2):80-89.  
 [11] 吴疆,张广东,杨兴有,等.四川万源晒烟调制方式对烟叶品质的影响[J].烟草科技,2014(11):80-83.  
 [12] 侯振武,赵晓军,单加杰,等.不同晒制方法对晒红烟调制过程中主要化学成分的影响[J].安徽农业科学,2014,42(20):6779-6782.  
 [13] 时向东,王旭锋,林开创,等.不同调制方法对晒红烟品质的影响[J].河南农业科学,2013,42(4):55-58.  
 [14] 尹永强,符云鹏,薛剑波,等.晒红烟晒制过程中主要化学成分含量变化[J].河南农业大学学报,2006,40(3):234-237,278.