

Box-Behnken设计-响应面法优化滇龙胆药材产地初加工工艺[△]

吴昕怡^{1*},刘秀薇¹,屈云慧¹,石萍萍¹,杨雁²,李智敏²,田浩^{1#},谷丽萍³(1.云南省农业科学院农产品加工研究所,昆明 650221;2.云南省农业科学院药用植物研究所,昆明 650205;3.红河学院生命科学与技术学院,云南红河 652399)

中图分类号 R282;R283.3 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2020)15-1830-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2020.15.07

摘要 目的:优化滇龙胆药材的产地初加工工艺。方法:采用高效液相色谱法测定滇龙胆中马钱苷酸、獐牙菜苦苷和龙胆苦苷的含量,再以上述3种成分含量的总评归一值(OD值)为评价指标,对热烫温度、热烫时间和干燥温度进行单因素试验;在此基础上,采用Box-Behnken设计-响应面法优化滇龙胆药材产地初加工工艺并进行验证,再与阴干样品进行比较。结果:滇龙胆药材产地初加工最优工艺为热烫时间5 min,热烫温度40℃,烘干温度60℃。验证试验结果显示,滇龙胆药材中3种成分的平均OD值为0.565 2,与预测值(0.570 6)的偏差为0.94%。与阴干样品比较,滇龙胆最优工艺样品中3种成分含量的OD值明显升高,表明优化工艺加工的滇龙胆样品质量更好。结论:优化的工艺稳定、可行,可用于滇龙胆药材的产地初加工。

关键词 滇龙胆;产地初加工;Box-Behnken设计;响应面法;总评归一值

Optimization of Primary Processing Technology of *Gentiana rigescens* by Box-Behnken Design-response Surface Method

WU Xinyi¹, LIU Xiuwei¹, QU Yunhui¹, SHI Pingping¹, YANG Yan², LI Zhimin², TIAN Hao¹, GU Liping³ (1. Agro-products Processing Research Institute, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming 650221, China; 2. Medicinal Plants Research Institute, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming 650205, China; 3. School of Life Science and Technology, Honghe University, Yunnan Honghe 652399, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To optimize the primary processing technology of *Gentiana rigescens*. **METHODS:** HPLC method was adopted for content determination of loganic acid, swertiamarin and gentiopicroside in *G. rigescens*, and overall desirability value (OD value) of the contents of above 3 components was taken as index to carry out single factor test on blanching temperature, blanching time and drying temperature. Based on that, Box-Behnken design-response surface methodology was used to optimize primary processing technology of *G. rigescens*. Validation test was also performed. The samples prepared by optimized technology were compared with those dried in the shade. **RESULTS:** The optimal primary processing technology of *G. rigescens* included blanching time of 5 min, blanching temperature of 40℃ and drying temperature of 60℃. Validation test showed that the average OD value of the 3 components was 0.565 2, with a deviation of 0.94% from the predicted value (0.570 6). Compared with samples dried in the shade, OD value of 3 components in samples prepared by optimized technology were increased significantly, indicating the quality of the samples prepared by the optimized technology was better. **CONCLUSIONS:** The optimal technology is stable and feasible, and can be used for the primary processing of *G. rigescens*.

KEYWORDS *Gentiana rigescens*; Primary processing technology; Box-Behnken design; Response surface method; Overall desirability value

产地初加工直接关系到中药材的质量及疗效^[1-2],而落后的加工经验和水平已严重制约了道地药材规模化、产业化发展^[2]。产地初加工是中药材采摘后加工的第一环节,更是药材品质形成的关键环节^[3-4]。适宜的产地

初加工方法,可以有效保留有效物质、提升药材品质。例如阴干处理的三七外观品质较优、质地坚实,且总皂苷、三七素等有效成分含量较高^[5];蒸、煮法处理天麻可分别提高其天麻素含量达2.0、2.5倍^[6]。

滇龙胆(*Gentiana rigescens* Franch. ex Hemsl)是龙胆科龙胆属多年生草本植物,以根和根茎入药^[7],是云南道地药材,具有清热燥湿、泻肝胆火的功效^[8]。现代药理学研究表明,其有效成分为马钱苷酸、獐牙菜苦苷、龙胆苦苷等裂环烯醚萜类化合物^[9-10]。滇龙胆药材为春、秋二季采挖,加工方式为洗净、干燥^[7]。本课题组前期调研

[△] 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.31860338);云南省科技计划面上项目(No.2017FB132);云南省科技计划重大科技专项(No.2017AB004)

* 硕士,研究实习员。研究方向:天然产物代谢调控。电话:0871-65515505。E-mail:ssslwxy@163.com

通信作者:副研究员,博士。研究方向:天然产物代谢及利用。电话:0871-65515505。E-mail:tianhao.630@163.com

发现,其产地初加工工艺主要为清水洗后直接干燥(晴天时采用晒干,阴天时采用阴干);农户凭主观经验操作,随意性较大,缺乏系统性、标准化的初加工规范,导致药材中有效成分含量高低不一。相关研究发现,产地初加工工艺、水洗时间、干燥温度对龙胆苦苷的含量具有显著影响^[11-12],水洗阴干的滇龙胆中龙胆苦苷含量较高,但工艺操作耗时长、成本高、效率低^[13]。另有研究发现,含苷类中药如黄芩^[14]、菊花^[15]等在采摘后均会进行热烫处理,能杀死植物细胞、使酶灭活,提高药材质量。基于此,本课题组以滇龙胆主要有效成分马钱苷酸、獐牙菜苦苷、龙胆苦苷含量的总评归一值(OD值)为考察指标,以热烫时间、热烫温度、干燥温度为考察因素,采用Box-Behnken设计-响应面法优化滇龙胆产地初加工工艺,以期为后期改进、规范滇龙胆道地药材的产地初加工方法提供参考。

1 材料

1.1 仪器

Waters1525型高效液相色谱仪,包括1525二元高压梯度泵、2707型自动进样器、2998二极管阵列检测器、Breeze2分析系统(美国Waters公司);AUY220型分析天平(日本Shimadzu公司);KQ5200E型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);HGZF-9053型台式电热鼓风干燥箱(上海跃进医疗器械有限公司);XMT-DA型电热恒温水浴锅(余姚市亚星仪器仪表有限公司)。

1.2 药品与试剂

滇龙胆药材于2019年1月采自云南省临沧市,经云南省农业科学药用植物研究所张金渝研究员鉴定为龙胆科龙胆属植物滇龙胆(*G. rigescens* Franch. ex Hemsl)的根茎;马钱苷酸对照品(批号:P01A9L67139,纯度:≥98%)、獐牙菜苦苷对照品(批号:S02D7D26161,纯度:≥98%)、龙胆苦苷对照品(批号:R2008F46237,纯度:≥98%)均购自上海源叶生物科技有限公司;甲醇、甲酸为分析纯,水为纯化水。

2 方法与结果

2.1 滇龙胆药材中主要有效成分的含量测定

2.1.1 色谱条件 参考Pan Y等^[16]的方法。色谱柱为Phenomenex C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相为甲醇(A)-0.1%甲酸水溶液(B),梯度洗脱(0~1.5 min, 7% A→10% A; 1.5~15 min, 10% A→26% A; 15~24 min, 26% A→54% A; 24~36 min, 54% A→90% A);流速为1.0 mL/min;检测波长为243 nm;柱温为30 ℃;进样量为10 μL。

2.1.2 混合对照品溶液的制备 分别精密称取马钱苷酸、獐牙菜苦苷、龙胆苦苷对照品4.8、5.2、10.4 mg,置于10 mL量瓶中,加入甲醇溶解并定容,制成马钱苷酸、獐

牙菜苦苷、龙胆苦苷质量浓度分别为0.48、0.52、1.04 mg/mL的混合对照品溶液,于4 ℃避光保存,备用。

2.1.3 供试品溶液的制备 参考Zhang JY等^[17]的方法,取滇龙胆阴干样品(取新鲜滇龙胆药材,洗净,阴干,即得;下同)适量,打粉,过三号筛。取药材粉末0.2 g,置于5 mL量瓶中,加入甲醇溶解并定容,混匀,称定质量,超声(功率:40 kHz,频率:600 W)提取1 h,再称定质量,用甲醇补足损失质量,混匀,用0.22 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.1.4 专属性试验 取空白对照溶液(甲醇溶液)和“2.1.2”项下混合对照品溶液、“2.1.3”项下供试品溶液适量,按“2.1.1”项下色谱条件进样分析,记录色谱图。结果,空白对照无干扰(图略),供试品溶液与混合对照品溶液在相应位置有相同色谱峰,理论板数以獐牙菜苦苷计不低于2 000,且各色谱峰与相邻峰间的分离度均大于1.5,表明本方法专属性强。色谱图见图1。

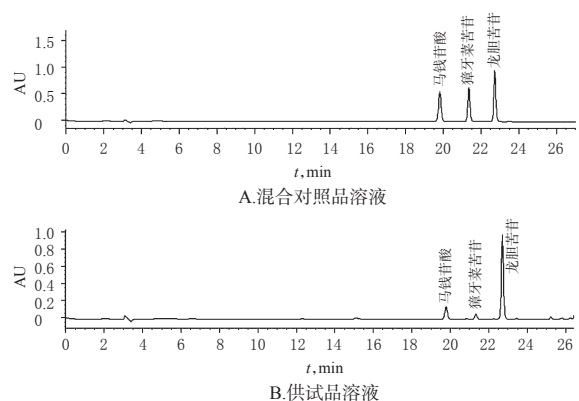


图1 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

2.1.5 线性关系、检测限与定量限考察 取“2.1.2”项下的混合对照品溶液,按“2.1.1”项下色谱条件分别进样1、5、10、15、20、30 μL进行分析,记录色谱图。以待测物进样量($x, \mu\text{g}$)为横坐标、峰面积为纵坐标(y)进行回归分析。另取“2.1.2”项下混合对照品溶液适量,用甲醇逐级稀释后进样分析,以信噪比3:1、10:1分别计算检测限、定量限。3种待测成分的回归方程、线性范围、检测限和定量限见表1。

表1 马钱苷酸、獐牙菜苦苷、龙胆苦苷的回归方程、线性范围、检测限和定量限

Tab 1 Regression equation, linear range, detection limit and quantitation limit of loganic acid, swertiamarin and gentiopicroside

成分	回归方程	R^2	线性范围, μg	检测限, μg	定量限, μg
马钱苷酸	$y=2\ 038\ 184.257x-348\ 159.925\ 5$	1.000 0	0.48~14.40	0.016	0.048
獐牙菜苦苷	$y=1\ 535\ 136.504x-514\ 336.812\ 8$	0.999 9	0.52~15.60	0.017	0.052
龙胆苦苷	$y=1\ 195\ 578.931x-334\ 621.988\ 7$	0.999 9	1.04~31.20	0.035	0.104

2.1.6 精密性试验 取“2.1.2”项下混合对照品溶液适量,按“2.1.1”项下色谱条件连续进样6次,记录峰面积。结果,马钱苷酸、獐牙菜苦苷、龙胆苦苷峰面积的RSD分别为0.46%、0.41%、0.36%($n=6$),表明仪器精密性良好。

2.1.7 稳定性试验 取“2.1.3”项下供试品溶液适量,在室温下放置0、2、4、6、8、10、12 h后按“2.1.1”项下色谱条件进样分析,记录峰面积。结果,马钱苷酸、獐牙菜苦苷、龙胆苦苷峰面积的RSD分别为1.48%、2.60%、1.56%($n=7$),表明供试品溶液在室温下放置12 h内稳定性良好。

2.1.8 重复性试验 称取滇龙胆阴干样品6份,按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液,然后按“2.1.1”项下色谱条件进样分析,根据标准曲线法计算3种成分的含量。结果,马钱苷酸、獐牙菜苦苷、龙胆苦苷含量的RSD分别为1.55%、1.55%、0.97%($n=6$),表明该方法的重复性良好。

2.1.9 加样回收率试验 取已知马钱苷酸、獐牙菜苦苷、龙胆苦苷含量的滇龙胆阴干样品0.1 g,平行6份,加入马钱苷酸、獐牙菜苦苷、龙胆苦苷质量浓度分别为0.26、0.102、2.6 mg/mL的混合对照品溶液(按“2.1.2”项下方法制备)2 mL,用甲醇溶解并定容后,按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1.1”项下色谱条件进样分析,记录峰面积并计算加样回收率。结果,马钱苷酸、獐牙菜苦苷、龙胆苦苷的平均加样回收率分别为96.09%、102.74%、102.05%,RSD分别为1.91%、1.23%、1.53%($n=6$),表明该方法的准确度良好,详见表2。

表2 加样回收试验结果($n=6$)

Tab 2 Results of recovery tests($n=6$)

成分	取样量, g	样品中含 量,mg	加入量, mg	测得量, mg	加样回收 率,%	平均加样回 收率,%	RSD, %
马钱苷酸	0.102 4	0.522 6	0.520 0	1.016 7	95.03	96.09	1.91
	0.102 2	0.521 6	0.520 0	1.015 6	95.01		
	0.103 2	0.526 7	0.520 0	1.025 0	95.88		
	0.103 2	0.526 7	0.520 0	1.045 3	99.74		
	0.105 0	0.535 8	0.520 0	1.033 6	95.86		
獐牙菜苦苷	0.103 2	0.526 7	0.520 0	1.020 6	95.05	102.74	1.23
	0.102 4	0.325 8	0.326 4	0.664 4	103.75		
	0.102 2	0.325 2	0.326 4	0.664 5	103.97		
	0.103 2	0.328 3	0.326 4	0.659 6	101.49		
	0.103 2	0.328 3	0.326 4	0.660 1	101.64		
龙胆苦苷	0.105 0	0.334 1	0.326 4	0.666 0	101.64	102.05	1.53
	0.103 2	0.328 3	0.326 4	0.667 7	103.95		
	0.102 4	5.234 5	5.200 0	10.662 7	104.36		
	0.102 2	5.224 2	5.200 0	10.610 7	103.57		
	0.103 2	5.275 4	5.200 0	10.554 7	101.50		
	0.103 2	5.275 4	5.200 0	10.511 6	100.69		
	0.105 0	5.367 4	5.200 0	10.596 6	100.54		
	0.103 2	5.275 4	5.200 0	10.561 7	101.64		

2.2 单因素试验

通过本课题组前期调研及预试验发现,热烫温度、

热烫时间和烘干温度对滇龙胆药材中有效成分马钱苷酸、獐牙菜苦苷、龙胆苦苷的含量影响较大,因此以这3个因素进行加工工艺的单因素考察。为了使试验结果较全面地反映滇龙胆的质量,本研究利用Hassan法^[18]对实际测得的马钱苷酸、獐牙菜苦苷、龙胆苦苷含量进行归一化,然后以三者的OD值作为评价指标进行试验:先将各成分含量的数值标准化为0~1之间的归一值(d),公式为 $d_i=(y_i-y_{\min})/(y_{\max}-y_{\min})$,其中 d_i 表示归一化后某成分的含量, y_i 表示归一化前某成分的含量, y_{\min} 表示归一化前某成分的最小含量, y_{\max} 表示归一化前某成分的最大含量;再根据各成分的 d 值求算几何平均值,即得这3种成分的OD值,OD值越高,表明滇龙胆药材质量越好。

2.2.1 热烫时间的考察 取新鲜滇龙胆药材,共5份,洗净,置于60℃水浴锅中,分别热烫处理1、2、3、4、5 min,再置于40℃烘箱中烘干至水分符合2015年版《中国药典》(一部)中龙胆药材的含水量规定(不得小于9.0%,下同)^[7]。取不同热烫时间处理并烘干后的滇龙胆样品,打粉,过三号筛,取适量粉末,按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1.1”项下色谱条件进样分析,根据标准曲线法计算马钱苷酸、獐牙菜苦苷、龙胆苦苷含量,再计算OD值。结果,随着热烫时间的增加,滇龙胆中3种有效成分的OD值呈先升高后降低的趋势;当热烫处理4 min时,OD值最大,详见表3。

表3 热烫时间考察结果

Tab 3 Results of blanching time test

热烫时间,min	马钱苷酸,%	獐牙菜苦苷,%	龙胆苦苷,%	OD值
1	0.605 2	0.195 2	6.052 4	0.156 0
2	0.616 4	0.198 7	6.163 8	0.334 5
3	0.622 5	0.205 2	6.225 4	0.547 0
4	0.638 9	0.205 0	6.388 9	0.748 4
5	0.629 8	0.200 7	6.297 9	0.556 7

2.2.2 热烫温度的考察 取新鲜滇龙胆药材,共5份,洗净,分别置于40、50、60、70、80℃水浴锅中,热烫处理4 min,再置于40℃烘箱中烘干至水分符合要求。取不同热烫温度处理并烘干后的滇龙胆样品,打粉,过三号筛,取适量粉末,按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1.1”项下色谱条件进样分析,根据标准曲线法计算马钱苷酸、獐牙菜苦苷、龙胆苦苷含量,再计算OD值。结果,随着热烫温度的升高,滇龙胆中3种成分的OD值呈先升高后降低的趋势;当热烫温度为60℃时,OD值最大,详见表4。

2.2.3 烘干温度的考察 取新鲜滇龙胆药材,共5份,洗净,置于60℃水浴锅中,热烫处理4 min,然后分别置于30、40、50、60℃烘箱中烘干至水分符合要求。取热烫处理并在不同温度下烘干后的滇龙胆样品,打粉,过三号筛,取适量粉末,按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液,再

表4 热烫温度考察结果

Tab 4 Results of blanching temperature test

热烫温度,℃	马钱苷酸,%	獐牙菜苦苷,%	龙胆苦苷,%	OD值
40	0.274 1	0.208 4	6.276 9	0.455 5
50	0.374 1	0.202 2	6.474 4	0.593 2
60	0.360 9	0.213 8	6.899 9	0.796 8
70	0.363 7	0.197 6	5.641 8	0.287 9
80	0.373 8	0.202 4	5.703 0	0.385 0

按“2.1.1”项下色谱条件进样分析,根据标准曲线法计算马钱苷酸、獐牙菜苦苷、龙胆苦苷含量,再计算OD值。结果,随着烘干温度的升高,滇龙胆中3种成分的OD值呈先升高后降低的趋势;当烘干温度为50℃时,OD值最大,详见表5。

表5 烘干温度考察结果

Tab 5 Results of drying temperature test

烘干温度,℃	马钱苷酸,%	獐牙菜苦苷,%	龙胆苦苷,%	OD值
30	0.167 2	0.206 0	6.598 8	0.3 914
40	0.298 3	0.192 2	6.243 5	0.5 424
50	0.302 8	0.195 5	6.450 7	0.5 931
60	0.302 2	0.185 3	6.242 0	0.4 777

2.3 Box-Behnken设计-响应面法优化滇龙胆产地初加工工艺

2.3.1 试验设计 根据单因素试验结果,以热烫时间(A)、热烫温度(B)、烘干温度(C)为自变量,以OD值为因变量(Y),设计3因素3水平的Box-Behnken试验。因素与水平见表6,试验设计与结果见表7。

表6 因素与水平

Tab 6 Factors and levels

水平	因素		
	A, min	B, ℃	C, ℃
-1	3	50	40
0	4	60	50
+1	5	70	60

表7 试验设计与结果

Tab 7 Experiment design and results

试验号	A	B	C	马钱苷酸,%	獐牙菜苦苷,%	龙胆苦苷,%	OD值
1	1	0	1	0.409 2	0.225 0	6.802 7	0.310 2
2	0	-1	-1	0.463 4	0.206 3	6.173 9	0.253 6
3	0	1	1	0.424 6	0.202 1	6.516 7	0.265 7
4	0	0	0	0.440 1	0.227 2	6.265 9	0.301 0
5	-1	0	-1	0.387 0	0.191 4	6.388 1	0.171 9
6	0	0	0	0.463 5	0.207 0	6.658 9	0.249 4
7	1	0	-1	0.323 2	0.196 9	5.715 3	0.095 7
8	0	1	-1	0.400 9	0.219 1	5.913 9	0.244 0
9	0	0	0	0.418 9	0.231 3	6.158 9	0.290 4
10	0	-1	1	0.516 1	0.249 9	7.279 3	0.451 4
11	-1	0	1	0.374 1	0.197 6	6.098 0	0.187 1
12	0	0	0	0.381 1	0.232 6	6.546 7	0.282 5
13	1	1	0	0.411 5	0.226 7	6.044 5	0.266 6
14	1	-1	0	0.892 8	0.253 0	6.374 6	0.514 9
15	-1	-1	0	0.520 1	0.228 1	6.295 3	0.339 6
16	0	0	0	0.384 4	0.224 1	6.147 1	0.259 1
17	-1	1	0	0.416 2	0.227 1	6.116 3	0.280 6

2.3.2 模型拟合与方差分析 利用Design Expert 8.0.5软件对试验数据进行拟合,并建立二次多元回归方程: $Y=0.276 5+0.026 0A-0.062 8B+0.056 2C-0.047 3AB+0.049 8AC-0.044 0BC-0.019 3A^2+0.093 2B^2-0.066 0C^2$ ($R^2=0.965 6$)。对其进行方差分析,结果见表8。

表8 方差分析结果

Tab 8 Analysis result of variance

来源	平方和	自由度	F	P	显著性
模型	0.142 6	9	21.806 1	0.000 3	极显著
A	0.002 5	1	7.461 1	0.029 3	显著
B	0.001 2	1	43.479 6	0.000 3	极显著
C	0.011 7	1	34.731 2	0.000 6	极显著
AB	0.010 3	1	12.335 9	0.009 8	极显著
AC	0.009 9	1	13.673 7	0.007 7	极显著
BC	0.000 3	1	10.675 5	0.013 7	显著
A ²	0.004 6	1	2.149 0	0.186 1	
B ²	0.021 1	1	50.358 8	0.000 2	极显著
C ²	0.010 4	1	25.257 4	0.001 5	极显著
残差	0.005 0	7			
失拟项	0.003 1	3	2.297 9	0.219 3	不显著
误差	0.001 9	4			
总离差	0.147 6	16			

由表8可知,模型 $F=21.806 1$, $P=0.000 3$ (<0.001),表明该模型拟合程度良好;另外, $R^2=0.965 6$,说明因变量的变化有96.56%来源于自变量,因此可用此模型和方程来分析预测滇龙胆药材产地初加工工艺条件。各因素对滇龙胆产地初加工工艺的影响程度大小排序依次为 $B>C>A$,即热烫温度>烘干温度>热烫时间,且3种因素的影响均具有统计学意义($P<0.05$)。

为进一步评价各因素之间的交互作用对滇龙胆药材产地初加工工艺的影响并确定最优工艺,本研究采用Design Expert 8.0.5软件绘制响应面图和等高线图,并进行分析,结果见图2。

由图2A可知,随着热烫温度的增加,OD值的变化不明显,而随着热烫时间的增加,OD值呈增加的趋势,响应面有倾斜度;由图2B可知,OD值随烘干温度和热烫时间的增加均分别呈现先升高后降低的趋势,响应面相对平缓,等高线呈圆环状;由图2C可知,随着热烫温度的增加,OD值的变化不明显,而随着烘干温度的增加,OD值呈现升高的趋势,响应面有倾斜度。结合表8可知,热烫时间与热烫温度两个因素之间、烘干温度与热烫时间两个因素之间的交互作用极显著($P<0.01$);热烫温度与烘干温度两个因素之间的交互作用显著($P<0.05$)。进一步得到滇龙胆药材产地初加工工艺最优工艺参数为热烫时间5 min,热烫温度50℃,烘干温度60℃;其预测OD值为0.570 6。

2.3.3 最优工艺验证及与阴干方法的比较 取新鲜滇龙胆药材,洗净,按“2.3.2”项下最优工艺参数进行处理,平行制备3批最优工艺样品;同时,另取新鲜滇龙胆药

表9 最优工艺验证及与阴干方法的比较结果

Tab 9 Results of optimal technology validation and its comparison with drying method in shade

样品	马钱苷酸, %	獐牙菜苦苷, %	龙胆苦苷, %	OD值
最优工艺样品	0.522 4	0.253 4	7.309 3	0.611 6
	0.545 6	0.268 8	7.411 9	1.000 0
	0.499 3	0.238 0	7.206 7	0.084 1
阴干样品	0.501 5	0.242 2	6.668 3	0.051 6
	0.503 7	0.247 2	6.676 2	0.095 0
	0.497 5	0.237 2	6.660 3	0.000 0

昔为主;该类化合物含有缩醛结构,在水中的稳定性较差,因此在滇龙胆药材加工过程中易受水洗、干燥温度、酶解等过程的影响^[12,19-22]。早期相关研究采用单因素试验考察了滇龙胆产地初加工工艺,但忽略了各因素间的相互作用,导致研究结果不一致。例如,米丽菊等^[23]的研究表明,药材晒干有利于活性成分的保留;然而左智天等^[13]的研究表明,药材阴干有利于活性成分的保留。

近年来,响应面法开始应用于药材的加工炮制领域^[24]。该方法是在传统各因素的“点”数据基础上对多因素整体的“面”数据进行科学性分析,最终精确找到最优的“点”^[25]。基于此,本研究采用Box-Behnken设计-响应面法优化滇龙胆初加工工艺,在前期调研和预试验的基础上,选择热烫时间、热烫温度、烘干温度为考察因素,最终确定最优的工艺参数为热烫时间5 min、热烫温度40 ℃、烘干温度60 ℃。

对于含苷类中药材的加工常采用烘干、炒制、蒸制、暴晒、热烫等方式来抑制或破坏药材内在酶的活性,以防止加工过程中苷类物质的破坏^[26]。例如,生栀子子在90 ℃水中热烫10 min后制得的干品中栀子苷的含量远高于生栀子^[27]。本研究也有类似发现,热烫时间和热烫温度均对滇龙胆中马钱苷酸、獐牙菜苦苷、龙胆苦苷含量的OD值具有显著影响($P < 0.05$)。从单因素试验结果可知,采用过低温度或者过高温度热烫处理的滇龙胆药材的OD值均不高,推测其原因可能是由于过低的温度未有效灭活滇龙胆药材中的酶,而过高的温度增加了滇龙胆中有效成分的水溶性,从而影响滇龙胆质量。另外,本研究将最优工艺所制得的滇龙胆样品与其阴干样品进行比较,结果发现,最优工艺样品中3种成分含量的OD值均高于阴干样品,由此可知热烫、烘干可提高滇龙胆药材质量。

综上所述,本研究优化了滇龙胆药材的产地初加工工艺,且经该工艺制得的滇龙胆药材质量较好,这可为滇龙胆药材产地初加工的质量控制、工艺标准化提供参考。

参考文献

[1] 汪雁玲.产地加工与中药饮片质量[J].时珍国医国药,

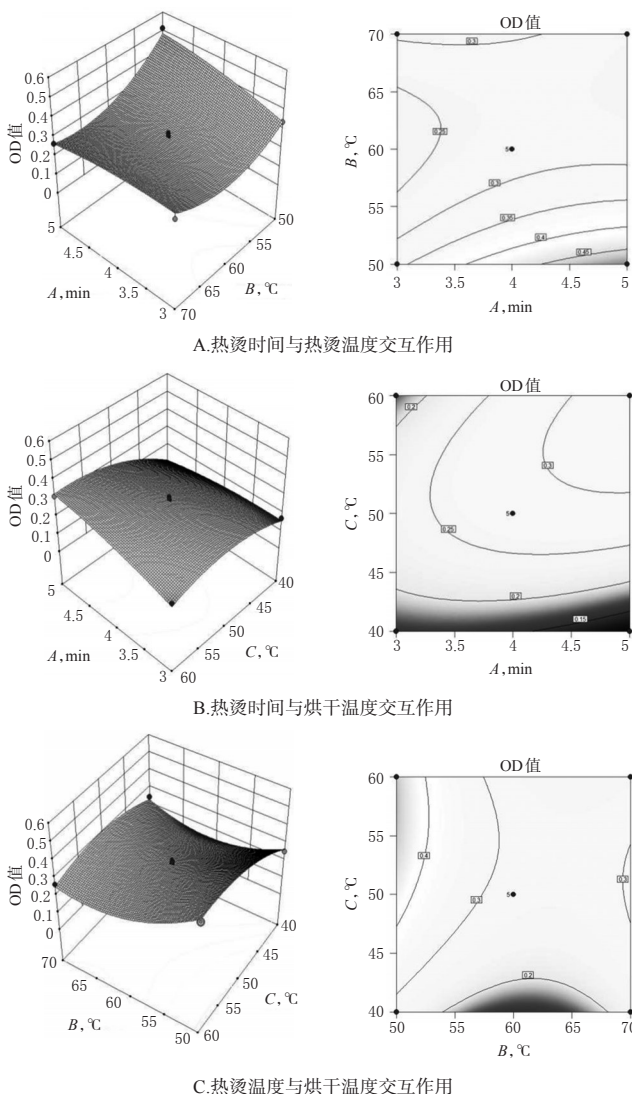


图2 各因素交互作用对滇龙胆OD值影响的响应面图和等高线图

Fig 2 Response surface and contour map of the effects of factors interaction effect on OD value of *G. rigescens*

材,洗净,平行制备3批阴干样品。取各样品打粉,过三号筛,取适量粉末,按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1.1”项下色谱条件进样分析,根据标准曲线法计算3种成分含量,并计算OD值,详见表9。结果,最优工艺所得滇龙胆药材中3种成分含量的平均OD值为0.565 2,与预测值(0.570 6)的偏差为0.94%,表明优化后的工艺稳定可行;与滇龙胆阴干样品比较,滇龙胆最优工艺样品3种成分含量的OD值明显升高,表明优化工艺加工的滇龙胆样品质量更好。

3 讨论

中药材产地初加工工艺对提高药材有效成分的含量具有重要意义。相关研究表明,滇龙胆中的有效成分以裂环烯醚萜类化合物马钱苷酸、獐牙菜苦苷、龙胆苦

- 2003, 14(9):559.
- [2] 杨俊杰,张振凌.中药材产地加工与地道药材相关性研究[J].时珍国医国药,2006,17(5):676-677.
- [3] 陈林伟,秦昆明,朱艳汇,等.中药材产地加工的研究现状及展望[J].中国中药杂志,2015,40(4):602-606.
- [4] 李秀萍.中药材的质量与采收和产地加工的研究[J].现代中药研究与实践,2011,25(6):22-23、46.
- [5] 刘勇,徐娜,陈骏飞,等.不同干燥方法对三七药材外观性状与内在结构及其品质的影响[J].中草药,2019,50(23):5714-5723.
- [6] 朱仕豪,阳楠,欧梓轩,等.天麻主要活性成分分离和鉴定及产地初加工方法对其含量的影响[J].湖南农业大学学报(自然科学版),2019,45(2):194-198、204.
- [7] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:96.
- [8] 赵志莲,张琳,刘卫红,等.滇龙胆裂环烯醚萜类活性成分积累规律的研究[J].时珍国医国药,2016,27(9):2073-2075.
- [9] JIANG RW, WONG KL, CHAN YM et al. Isolation of iridoid and secoiridoid glycosides and comparative study on *Radix gentianae* and related adulterants by HPLC analysis[J]. *Phytochemistry*, 2005, 66(22):2674-2680.
- [10] XU M, YANG CR, ZHANG YJ. Minor antifungal aromatic glycosides from the roots of *Gentianarigescens* (Gentianaceae) [J]. *Chin Chem Letters*, 2009, 20(10):1215-1217.
- [11] 曹悦,左代英,孟庆龙,等.不同采收期和加工方法对龙胆药材含量的影响[J].中国药事,2010,24(1):75-77.
- [12] 饶高雄,普建英,高运玲,等.加工方法对龙胆生药中龙胆苦苷含量的影响[J].云南中医学院学报,2002,25(2):1-2.
- [13] 左智天,王元忠,张霁,等.不同初加工滇龙胆HPLC指纹图谱及其有效成分含量测定[J].西南农业学报,2017,30(3):535-541.
- [14] 宋双红,王炳利,冯军康,等.不同加工方法对黄芩炮制品质量影响的研究[J].中药材,2006,29(9):893-895.
- [15] QIN S, WEN XS, SHEN T, et al. Thin layer drying characteristics and quality evaluation of steam blanched *chrysanthemum*[J]. *Transactions of the CSAE*, 2011, 27(6):357-364.
- [16] PAN Y, SHEN T, PAN J, et al. Development and validation of a UPLC-MS/MS method for the simultaneous determination and detection of four neurotogenic compounds in different parts of *Gentianarigescens* Franch using multiple reaction monitoring and precursor ion scanning[J]. *Analytical Methods*, 2014, 6(6):1782-1787.
- [17] ZHANG JY, SHEN T, WANG YZ, et al. Effect of cultivation condition on the active component contents in *Gentianarigescens*, a traditional Chinese medicine[J]. *Afr J Pharm Pharmacol*, 2013, 7(18):1096-1102.
- [18] 赵重博,王晶,吴建华,等.响应面法优化秦皮产地加工与饮片炮制一体化工艺研究[J].中草药,2018,49(20):4753-4759.
- [19] YANG JL, LIU LL, SHI YP. Phytochemicals and biological activities of *Gentiana* species[J]. *Nat Prod Commun*, 2010, 5(4):649-664.
- [20] 褚博文,张霁,李智敏,等.滇龙胆化学成分和药理作用研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2016,22(13):213-222.
- [21] 李智敏,刘莉,李晚谊,等.滇龙胆的药用资源研究与开发进展[J].云南大学学报(自然科学版),2009,31(S1):485-487.
- [22] 刘艳红,李兴从,刘玉清,等.秦艽中的环烯醚萜苷成分[J].云南植物研究,1994,16(1):85-89.
- [23] 米丽菊,张霁,赵艳丽,等.红外光谱在滇龙胆干燥方法选择上的应用[J].时珍国医国药,2015,26(11):2656-2659.
- [24] 许天阳,董坤园,宋凤媛,等. Box-Behnken 响应面法优化炒赤芍炮制工艺[J].中国药房,2019,30(20):2845-2850.
- [25] 高娟,王亚洲,孙文基.加工炮制对秦艽中龙胆苦苷的影响[J].中草药,2006,37(9):1357-1358.
- [26] 蒋元斌,林丛发,郭慧慧,等.水浴热烫炮制对梔子中梔子苷含量的影响[J].时珍国医国药,2018,29(5):1100-1102.
- [27] TIAN H, LI WY, XIAO D, et al. Negative-pressure cavitation extraction of secoisolariciresinol diglycoside from flaxseed cakes[J]. *Molecules*, 2015, 20(6):11076-11089.

(收稿日期:2020-04-23 修回日期:2020-06-03)

(编辑:唐晓莲)

《中国药房》杂志——中国科技核心期刊, 欢迎投稿、订阅