

## 多指标正交试验优选鳖血柴胡的炮制工艺

于欢<sup>1,2</sup>, 李小宁<sup>2</sup>, 钟凌云<sup>2</sup>, 张金莲<sup>2</sup>, 宁希鲜<sup>2</sup>, 阳强<sup>2</sup>, 龚千锋<sup>1,2\*</sup>

(1. 北京中医药大学 中药学院, 北京 100102; 2. 江西中医药大学 药学院, 南昌 330004)

**[摘要]** 目的: 优选鳖血柴胡的炮制工艺。方法: 以柴胡皂苷 a, c, d 及醇溶性浸出物含量的综合评分为指标, 通过正交试验考察炮制时间、鳖血用量、炮制温度对鳖血柴胡炮制工艺的影响。采用 HPLC 测定柴胡皂苷 a, c, d 的含量, 流动相乙腈(A)-水(B)梯度洗脱(0~50 min, 25%~90% A; 50~55 min, 90% A), 检测波长 210 nm。结果: 炒制时间对炮制工艺具有显著性影响。最佳炮制工艺为 150 ℃ 炮制 10 min, 加鳖血量 0.05 mL·g<sup>-1</sup>。醇溶性浸出物及柴胡皂苷 a, c, d 质量分数分别为 12.42%, 0.85%, 0.23%, 0.90%。结论: 优选的炮制工艺合理可靠、重复性好, 为规范鳖血柴胡饮片的炮制加工提供参考。

**[关键词]** 鳖血柴胡; 柴胡皂苷 a; 柴胡皂苷 c; 柴胡皂苷 d; 醇溶性浸出物

**[中图分类号]** R283.3; R284.1; R943.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)15-0008-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2015150008

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20150610.0952.010.html>

**[网络出版时间]** 2015-06-10 9:52

### Optimization of Stir-frying Processing Technology of Bupleuri Radix with Turtle Blood by Orthogonal Test

YU Huan<sup>1,2</sup>, LI Xiao-ning<sup>2</sup>, ZHONG Ling-yun<sup>2</sup>, ZHANG Jin-lian<sup>2</sup>, NING Xi-xian<sup>2</sup>, YANG Qiang<sup>2</sup>, GONG Qian-feng<sup>1,2\*</sup> (1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China; 2. School of Pharmacy, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)

**[Abstract]** **Objective:** To optimize processing technology of Bupleuri Radix with turtle blood. **Method:** With composite score of saikosaponin a, c, d and ethanol soluble extractives as index, an orthogonal test was adopted to investigate influence of processing time, turtle blood amount and processing temperature on processing technology of Bupleuri Radix processed with turtle blood. HPLC was adopted to determine contents of saikosaponin a, c, d and eluted in gradient with mobile phase of acetonitrile-water, detection wavelength was at 210 nm. **Result:** Stir-frying time had a significant influence on processing technology. According to optimum processing technology, processing temperature was set at 150 ℃, processing time was 10 min, the amount of turtle blood was 0.05 mL·g<sup>-1</sup>. Mass fractions of ethanol soluble extractives and saikosaponin a, c, d were 12.42%, 0.85%, 0.23%, 0.90%, respectively. **Conclusion:** This optimized processing technology is reasonable, reliable and highly reproducible, it can provide a reference for processing of Bupleuri Radix processed with turtle blood.

**[Key words]** Bupleuri Radix processed with turtle blood; saikosaponin a; saikosaponin c; saikosaponin d; ethanol soluble extractives

柴胡具有疏散退热、疏肝解郁、升举阳气的功效, 用于治疗感冒发热、寒热往来、胸胁胀痛、月经不调、子宫脱垂、脱肛<sup>[1]</sup>, 主要化学成分为三萜皂苷

类、挥发油、黄酮类、多糖类<sup>[2]</sup>。其加工炮制品有醋柴胡、鳖血柴胡、酒柴胡、蜜炙柴胡等<sup>[3]</sup>, 以鳖血柴胡文献报道最少。鳖血柴胡能填阴滋血, 抑制其浮

**[收稿日期]** 20150330(004)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81260642)

**[第一作者]** 于欢, 在读博士, 从事中药饮片质量研究与炮制机制研究, Tel: 0791-87118852, E-mail: yuhuanhebei@163.com

**[通讯作者]** \* 龚千锋, 博士生导师, 教授, 从事中药炮制传承、饮片质量标准与炮制机制研究, Tel: 0791-87118852, E-mail: gongqf2002@163.com

阳之性,增强清肝退热的功效,可用于热入血室、骨蒸劳热。鳖血柴胡饮片的炮制工艺收载于 1963 年版《中国药典》和 2008 年版《江西省中药饮片炮制规范》,取柴胡定量,鲜鳖血以定量黄酒<sup>[4]</sup>或水<sup>[5]</sup>闷润,待润透后以文火炒干,即得。现仍作为一种特色炮制方法被樟树帮地方炮制沿用,每用须临方炮制<sup>[5]</sup>。现多用于临床上肝脾肿大、高热谵语的患者。本实验以柴胡皂苷 a, c, d 及醇溶性浸出物含量为评价指标,选择炮制时间、加鳖血量、炮制温度为考察因素,采用正交试验优选鳖血柴胡的炮制工艺,为制订该饮片的质量标准与炮制规范提供参考。

## 1 材料

UltiMate3000 型高效液相色谱仪(美国戴安公司),FA1004N 型电子分析天平(上海精密科学仪器有限公司),TN408LC 型红外测温枪(上海仪迷杰光电技术有限公司)。柴胡药材(批号 20130624)购于陕西省宝鸡市陈仓区种植基地,经江西中医药大学范崔生教授鉴定为 *Bupleurum chinense* 的干燥根茎,中华鳖(批号 20140728)购于江西省军山湖甲鱼养殖基地,经江西省中医药大学范崔生教授鉴定为 *Trionyx sinensis*。柴胡皂苷 a, c, d 对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为 10076-201207, C08-130616, 10080-201207),黄酒(浙江塔牌绍兴酒有限公司),甲醇、乙腈为色谱纯,水为自制双蒸水,其他试剂均为分析纯。

## 2 方法及结果

### 2.1 样品的制备

**2.1.1 柴胡饮片** 取柴胡药材,除去杂质和残茎,洗净泥沙,用湿纱布润透,切段(约 1 cm),风干或低温干燥(40 ℃),筛去灰屑,备用。

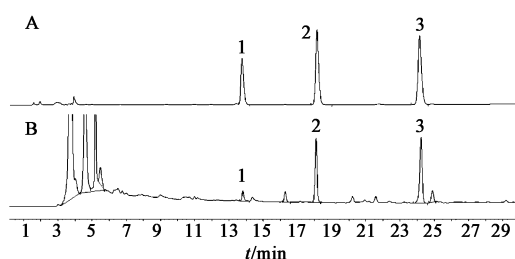
**2.1.2 鳖血** 将中华鳖的四肢固定,颈动脉取血,加入适量黄酒搅拌,备用。

**2.1.3 鳖血柴胡** 取适量柴胡饮片置于烧杯中,加入适量鳖血,拌匀,待鳖血吸尽后于铜锅中,用铜铲以文火加热炒干。

### 2.2 柴胡皂苷 a, c, d 的含量测定

**2.2.1 色谱条件** Prevail C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈(A)-水(B)梯度洗脱(0 ~ 50 min, 25% ~ 90% A; 50 ~ 55 min, 90% A),检测波长 210 nm,流速 1 mL·min<sup>-1</sup>,柱温 30 ℃,进样量 20 μL。见图 1。

**2.2.2 对照品溶液的制备** 精密称取柴胡皂苷 a, c, d 对照品适量,分别用甲醇溶解并配制成一定质量浓度的对照品溶液。分别吸取各对照品溶液适



A. 对照品; B. 供试品; 1. 柴胡皂苷 c; 2. 柴胡皂苷 a; 3. 柴胡皂苷 d

图 1 鳖血柴胡 HPLC

Fig. 1 HPLC chromatogram of Bupleuri Radix processed with turtle blood

量,置于同一量瓶中,得柴胡皂苷 a, c, d 质量浓度分别为 0.356, 0.248, 0.348 g·L<sup>-1</sup> 的混合对照品溶液。

**2.2.3 供试品溶液配制** 精密称取鳖血柴胡粉末(过四号筛)约 0.5 g,置具塞锥形瓶中,加入含 5% 浓氨甲醇溶液 25 mL, 密塞, 30 ℃ 水温超声处理 30 min, 过滤, 用甲醇 20 mL 分 2 次洗涤容器及药渣, 洗液与滤液合并, 回收溶剂至干, 残渣加甲醇定容至 5 mL, 临用前过 0.45 μm 微孔滤膜, 即得。

**2.2.4 标准曲线绘制** 将混合对照品溶液适量, 稀释, 配置成系列对照品溶液, 按 2.2.1 项下色谱条件测定, 以峰面积为纵坐标, 质量浓度为横坐标, 得柴胡皂苷 a, c, d 回归方程分别为  $Y = 1.5124X + 0.4418$  ( $R^2 = 0.9998$ ),  $Y = 0.8416X + 0.2430$  ( $R^2 = 0.9999$ ),  $Y = 1.5884X + 0.5288$  ( $R^2 = 0.9998$ ), 线性范围依次为 0.356 ~ 10.680, 0.248 ~ 7.440, 0.348 ~ 10.440 μg。

**2.2.5 精密度考察** 取同一混合对照品溶液, 按 2.2.1 项下色谱条件连续进样 6 次, 计算柴胡皂苷 a, c, d 峰面积的 RSD 均为 0.6%, 表明仪器精密度良好。

**2.2.6 稳定性试验** 取同一供试品溶液, 室温密闭放置, 按 2.2.1 项下色谱条件分别在制备后 0, 2, 4, 6, 8, 12 h 测定, 计算柴胡皂苷 a, c, d 峰面积的 RSD 分别为 0.8%, 0.9%, 0.9%, 表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

**2.2.7 重复性试验** 取同一样品粉末 6 份, 按 2.2.3 项下方法制备供试品溶液, 按 2.2.1 项下色谱条件测定, 计算柴胡皂苷 a, c, d 峰面积的 RSD 分别为 0.8%, 0.9%, 0.8%, 表明本方法重复性良好。

**2.2.8 加样回收率试验** 精密称取已知指标成分含量的样品 6 份, 每份约 0.5 g, 各精密加入一定量柴胡皂苷 a, c, d 对照品, 按 2.2.3 项下方法制备供试品溶液, 按 2.2.1 项下条件测定, 结果见表 1。

表 1 鳖血柴胡中柴胡皂苷 a, c, d 含量测定的加样回收率试验

Table 1 Recovery test for saikosaponin a, c, d in Bupleuri Radix processed with turtle blood

成分	称样量/g	样品中量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均值/%	RSD/%
柴胡皂苷 a	0.501 3	3.274 0	3.276 3	6.540 1	99.69	99.81	2.0
	0.502 1	3.279 2	3.276 3	6.521 3	98.96		
	0.502 4	3.281 2	3.276 3	6.663 1	103.22		
	0.500 7	3.270 1	3.276 3	6.501 7	98.64		
	0.500 9	3.271 4	3.276 3	6.463 1	97.42		
	0.502 5	3.281 8	3.276 3	6.588 2	100.92		
柴胡皂苷 c	0.501 3	0.886 8	0.887 4	1.753 1	97.62	98.81	1.9
	0.502 1	0.888 2	0.887 4	1.784 2	100.97		
	0.502 4	0.888 7	0.887 4	1.753 8	97.49		
	0.500 7	0.885 7	0.887 4	1.753 2	97.76		
	0.500 9	0.886 1	0.887 4	1.786 4	101.45		
	0.502 5	0.888 9	0.887 4	1.754 5	97.54		
柴胡皂苷 d	0.501 3	3.323 1	3.325 4	6.748 2	102.99	99.78	2.2
	0.502 1	3.328 4	3.325 4	6.6342	99.41		
	0.502 4	3.330 4	3.325 4	6.583 1	97.81		
	0.500 7	3.319 1	3.325 4	6.577 6	97.99		
	0.500 9	3.320 5	3.325 4	6.714 2	102.05		
	0.502 5	3.331 1	3.325 4	6.603 6	98.41		

2.3 正交试验优选 在预试验基础上,选取鳖血用量、炒制温度及时间为考察因素,每个因素取 3 个水平,选用  $L_9(3^4)$  正交表安排试验,取切制后的药材 100 g,共 9 份,试验安排及结果见表 2。醇溶性浸出物按 2010 年版《中国药典》一部附录 X A 浸出物测定法测定。以柴胡皂苷 a, c, d 及醇溶性浸出物含量的综合评分为指标,权重系数分别为 20%, 20%, 20%, 40%, 各指标的取值越大越好。方差分析利用 SPSS 16.0 软件处理,结果见表 3。由直观分析可知,各因素对炮制工艺的影响顺序为  $C > B > A$ 。方

差分析表明因素 C 对综合评分具有显著性影响,因素 A, B 则均无显著性影响。因素 A 与柴胡皂苷 a, c, d 含量存在一定的负相关,因素 B, C 则与三者的含量存在一定正相关。综合分析,确定鳖血柴胡最佳炮制工艺条件为每 100 g 柴胡加鳖血量 5 mL,炒制温度 150 °C,炒制时间 10 min。取切制后的柴胡药材 100 g,切制成段,共 3 份,按优选的炮制工艺进行验证试验,结果醇溶性浸出物和柴胡皂苷 a, c, d 质量分数平均值分别为 12.42%, 0.85%, 0.23%, 0.90%, RSD 依次为 0.5%, 0.5%, 0.004%, 0.02%。

表 2 鳖血柴胡炮制工艺正交试验安排及直观分析

Table 2 Orthogonal test analysis for processing technology of Bupleuri Radix with turtle blood

No.	A 鳖血用量 /mL	B 炒制温度 /°C	C 炒制时间 /min	D(空白)	醇浸出物 /%	柴胡皂苷 a /%	柴胡皂苷 c /%	柴胡皂苷 d /%	综合评分 /分
1	5	90	6	1	11.13	0.653 1	0.176 9	0.662 9	82.79
2	5	120	8	2	12.33	0.621 4	0.154 8	0.708 1	84.45
3	5	150	10	3	13.53	0.750 3	0.146 5	0.850 4	93.99
4	10	90	8	3	11.12	0.575 0	0.152 5	0.745 3	80.29
5	10	120	10	1	11.73	0.623 0	0.160 1	0.808 7	85.59
6	10	150	6	2	11.19	0.673 3	0.172 5	0.711 7	84.24
7	15	90	10	2	12.06	0.642 5	0.190 3	0.748 3	88.55
8	15	120	6	3	10.17	0.560 5	0.209 5	0.560 6	78.19
9	15	150	8	1	11.22	0.675 1	0.183 0	0.784 7	87.09

表 3 综合评分方差分析

Table 3 Variance analysis of comprehensive score

方差来源	SS	MS	F	P
A	21.333	10.667	5.516	>0.05
B	54.523	27.262	14.097	>0.05
C	92.625	46.313	23.948	<0.05
D(误差)	3.868	1.934		

注:  $F_{0.05}(2, 2) = 19$ 。

### 3 讨论

鳖血柴胡饮片借鳖血阴液之性缓柴胡劫阴之性,对于真脏虚损之邪热疗效显著,在明清时期临床运用比较活跃、流传较广,古代医家认为其“鳖血炒滋阴治劳热、肌热”,“鳖血炒治三日疟、温疟,或入肝散热”<sup>[8]</sup>。并被全国炮制主流帮派之一的樟树帮纳为特色炮制方法流传至今。鳖血柴胡的现代研究较少,作为一个脱胎于古代经验古方的中药饮片,在饮片质量方面,缺乏规范化研究与质控标准。本文通过化学成分变化考察了不同炮制时间、鳖血用量、炮制温度对鳖血柴胡炮制工艺的影响,明确了该饮片的炮制工艺。以该工艺炮制的鳖血柴胡饮片,外观性状与柴胡生品相比色泽加深,有血腥气;以 2010 年版《中国药典》一部附录 IX H 第一法测定鳖血柴胡饮片的水分含量 5%,与柴胡生品的含水量(9%)相比有所下降。但由于缺乏统一的炮制

规范及质量控制标准,制约了鳖血柴胡饮片的规模化生产与推广。本文建立的鳖血柴胡炮制工艺,既遵循了传统炮制原则,又结合了现代分析技术,为鳖血柴胡饮片质量标准的制定提供了实验依据,同时为该饮片的炮制机制研究奠定了基础。

#### [参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:230-231.
- [2] 史青, 聂淑琴, 黄璐琦. 柴胡属植物化学成分及药理研究新进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2002, 8(5): 53-56.
- [3] 龚千锋. 中药炮制学[M]. 北京:中国中医药出版社, 2012:237.
- [4] 江西省食品药品监督管理局. 江西省中药饮片炮制规范[M]. 上海:上海科学技术出版社,2009:123.
- [5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:人民卫生出版社,1963:237-238.
- [6] 龚千锋. 樟树中药炮制全书[M]. 南昌:江西科学技术出版社,1990:111.
- [7] 宁希鲜, 陈泣, 于欢, 等. 正交试验法优选蜜糠炒枳壳炮制工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(23): 28-31.
- [8] 陆以湑. 冷庐医话[M]. 上海:上海科学技术出版社, 1959:115.

[责任编辑 刘德文]

## 《中国实验方剂学杂志》入选 2015—2016 年度 CSCD(E)

经过中国科学院“中国科学引文数据库(Chinese Science Citation Database, 简称 CSCD)”定量遴选、专家定性评估,《中国实验方剂学杂志》入选 2015—2016 年度 CSCD(E)。

2015—2016 年度 CSCD 收录来源期刊 1200 种,其中中国出版的英文期刊 194 种,中文期刊 1006 种。CSCD 来源期刊分为核心库和扩展库两部分,其中核心库 872 种(以备注栏中 C 为标记);扩展库 328 种(以备注栏中 E 为标记)。

CSCD 具有建库历史最为悠久、专业性强、数据准确规范、检索方式多样、完整、方便等特点,自提供使用以来,深受用户好评,被誉为“中国的 SCI”。CSCD 是我国第一个引文数据库,曾获中国科学院科技进步二等奖。该数据库已在我国科研院所、高等学校的课题查新、基金资助、项目评估、成果申报、人才选拔以及文献计量与评价研究等多方面作为权威文献检索工具获得广泛应用。