

龙胆苦苷的提取纯化工艺优化及其活性评价

谢彩虹, 李忠逵, 黄娟婷, 王真史, 唐芳勇, 杨霞卿, 朱洪, 魏要武*

(广州市中通生化制品有限公司, 广东广州 511400)

摘要: 该研究以龙胆全草为原料, 纯水为提取溶剂, 采用加热搅拌法提取龙胆苦苷, 通过 $L_9(3^4)$ 正交试验确定最佳提取工艺条件。采用 AB-8 型大孔吸附树脂对龙胆提取物进行纯化, 通过单因素试验确定最佳纯化工艺条件, 并对龙胆苦苷的抗氧化、抑菌和抗炎活性进行研究。结果表明: 最佳提取工艺条件是料液比为 1:15, 提取温度为 85 °C, 搅拌提取 1 h, 提取 3 次。在此条件下, 龙胆苦苷提取率为 88.77%, 提取前后的纯度分别为 5.70% 和 13.34%。最佳纯化工艺条件是树脂: 药材为 2.5:1, 上样液质量浓度为 0.15 g/mL (生药材), 上样量为 2.67 个柱床体积 (Bed Volume, BV), 上样流速为 1 BV/h, 纯水用量为 3 BV, 洗脱流速为 2 BV/h, 体积分数为 30% 的乙醇用量为 4 BV, 洗脱流速为 3 BV/h。在此条件下, 龙胆苦苷洗脱率为 82.14%, 纯度为 50.63%。活性试验表明, 龙胆苦苷对 DPPH 自由基的清除率为 93.36%, 对马拉色菌的抑菌圈直径为 15.50 mm, 对炎症因子 NO、TNF- α 、IL-1 α 的抑制率分别为 97.67%、93.50% 和 97.03%, 对小鼠耳肿胀有显著抑制作用, 耳肿胀率为 126.88%。该研究对龙胆苦苷的提取纯化工艺进行了优化, 使活性物纯度提高 8 倍左右。另外, 还初步探究了龙胆苦苷的抗氧化、抑菌和抗炎活性, 推测通过优化提取纯化工艺, 可以提高龙胆苦苷的纯度, 从而使其活性增强。该研究表明, 龙胆苦苷具有良好的抗氧化、抑菌和消肿抗炎作用, 将为龙胆的合理开发利用提供重要依据。

关键词: 龙胆; 龙胆苦苷; 单因素试验; 正交试验; 抗氧化活性; 抑菌活性; 抗炎活性

文章编号: 1673-9078(2025)03-319-328

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2025.3.1471

Extraction and Purification Process Optimization and Activity Assessment of Gentiopicroside

XIE Caihong, LI Zhongkui, HUANG Juanting, WANG Zhenshi, TANG Fangyong,
YANG Xiaqing, ZHU Hong, WEI Yaowu*

(Guangzhou Cenkon Biochemical Products Co. Ltd., Guangzhou 511400, China)

Abstract: Whole *Gentiana scabra* bunge plants were subjected to extraction using an aqueous solvent, combined with heating and stirring, to obtain gentiopicroside. Optimal extraction conditions were determined using a nine-run, four-factor, three-level orthogonal test. The *G. scabra* bunge extract was purified using an AB-8 macroporous adsorption resin. Optimal purification conditions were determined by single-factor experiments, and the antioxidant, antibacterial, and anti-inflammatory activities of gentiopicroside were examined. The optimal extraction process required a solid:solvent ratio of 1:15, extraction temperature of 85 °C, stirring extraction duration of 1 h, and three extraction cycles. The extraction yield of gentiopicroside was 88.77%. The purities before and after purification were 5.70% and 13.34%, respectively. The optimal purification process

引文格式:

谢彩虹,李忠逵,黄娟婷,等.龙胆苦苷的提取纯化工艺优化及其活性评价[J].现代食品科技,2025,41(3):319-328.

XIE Caihong, LI Zhongkui, HUANG Juanting, et al. Extraction and purification process optimization and activity assessment of gentiopicroside [J]. Modern Food Science and Technology, 2025, 41(3): 319-328.

收稿日期: 2023-12-11

作者简介: 谢彩虹 (1997-), 女, 硕士, 研究方向: 药食同源植物活性物分离纯化及活性研究, E-mail: caihong-xie@foxmail.com

通讯作者: 魏要武 (1988-), 男, 硕士, 助理研究员, 研究方向: 药食同源植物活性物分离纯化及活性研究, E-mail: weiyw@cenkon.com

involved a wet resin:medicinal material ratio of 2.5:1, loading liquid concentration of 0.15 g/mL, loading volume of 2.67 BV, loading flow rate of 1 BV/h, volume of 3 BV, and elution flow rate of 2 BV/h for pure water, and a volume of 4 BV and elution flow rate of 3 BV/h for 30% (*V/V*) ethanol. The corresponding elution rate and purity of gentiopicroside were 82.14% and 50.63%, respectively. The purified gentiopicroside exhibited a scavenging rate of 93.36% for DPPH radical, inhibitory zone diameter of 15.50 mm for *Malassezia*, and inhibition rates of 97.67%, 93.50%, and 97.03% for NO, TNF- α , and IL-1 α , respectively. Gentiopicroside significantly inhibited ear swelling in mice, resulting in a reduction of the ear swelling rate to 126.88%. Using the optimized techniques for gentiopicroside extraction and purification resulted in an increase in the purity of the active substance by approximately 8 fold. The antioxidant, antibacterial, and anti-inflammatory activities of gentiopicroside were preliminarily assessed. It was speculated that gentiopicroside activity could be enhanced by improving its purity through optimization of the extraction and purification processes. This study clarified that gentiopicroside exhibits excellent antioxidant, antibacterial, and anti-inflammatory effects, establishing a crucial foundation for the rational development and utilization of *G. scabra bunge*.

Key words: *Gentiana scabra bunge*; gentiopicroside; single-factor experiment; orthogonal test; antioxidant activity; antibacterial activity; anti-inflammatory activity

龙胆, 别称为地胆草、龙胆草、四叶胆等, 为龙胆科植物条叶龙胆 (*Gentiana manshurica* Kitag.)、龙胆 (*Gentiana scabra* Bge.)、三花龙胆 (*Gentiana triflora* Pall.) 或坚龙胆 (*Gentiana rigescens* Franch.) 的干燥根和根茎^[1]。中药龙胆具有悠久的药用历史, 始载于《神农本草经》^[2], 其味苦性寒, 归肝、胆经, 具有清热燥湿、泻肝胆火的功效^[1]。《救荒本草》^[3]中对龙胆作为野菜的做法也有相关记载, “叶燥热, 浸去苦味, 油盐调食, 勿空腹服。此草苦寒, 茎叶微细, 欲求裹腹难矣。”龙胆中存在多种化学成分, 其主要活性成分为龙胆苦苷, 属于裂环烯醚萜苷类化合物, 被中国药典定为质量标准控制的目标成分^[4,5], 其分子结构如图1所示。现代药理研究表明, 龙胆苦苷具有抗炎、抗氧化、抑菌、保肝及健胃利胆等活性^[6-8], 主要用于治疗肝胆疾病、皮肤病、急性咽炎、慢性支气管炎、酒精性肝损伤、糖尿病肾病等疾病^[9-11], 具有十分重要的研究和开发价值。龙胆苦苷可溶于水、甲醇、乙醇等溶剂中, 难溶于亲脂性有机溶剂^[12]。目前, 常用的龙胆苦苷提取方法包括超声提取、微波提取、回流提取、组织破碎提取和闪式提取, 分离纯化方法主要有大孔树脂、硅胶、MCI树脂、制备液相、逆流色谱和离子交换树脂等^[12]。其中, 徐泽红等^[13]比较了不同型号的大孔树脂对龙胆苦苷的吸附和解吸附能力, 发现 AB-8 型树脂具有较好的纯化效果。以上常用的提取纯化方法大多涉及有机溶剂或酸碱, 存在污染环境、费时、费力等问题。在龙胆苦苷提取实验中, 常用的提取溶剂有甲醇和不同浓度的乙醇, 但选择

纯水作为提取溶剂的研究还相对欠缺。虽然龙胆苦苷在甲醇和乙醇中溶解度大, 但甲醇对黏膜具有强刺激性, 毒性较大, 不适合用于药用有效成分的提取, 而乙醇与纯水相比, 存在成本高、易燃易爆、需要单独配备防爆车间等问题。因此, 本文选择纯水作为提取溶剂, AB-8 型大孔吸附树脂作为纯化方法进行研究, 为龙胆苦苷提取溶剂和纯化方法的选择提供更多的参考。

本研究以龙胆中的主要活性成分龙胆苦苷为考察指标, 采用加热搅拌法提取龙胆中的龙胆苦苷, 在单因素试验的基础上, 设计了 $L_9(3^4)$ 正交试验, 对提取温度、料液比、提取时间和提取次数这四个影响龙胆苦苷含量的因素进行优选, 从而确认最佳提取工艺条件。接着, 采用 AB-8 型大孔吸附树脂对龙胆提取物进行纯化, 通过单因素试验对上样液质量浓度、纯水用量、纯水洗脱流速、解吸液用量和解吸液洗脱流速进行优选, 从而确认最佳纯化工艺条件。同时, 通过 DPPH 自由基清除试验、马拉色菌抑制试验、巨噬细胞炎症因子分泌抑制试验和小鼠耳肿胀抗炎试验, 对龙胆苦苷的抗氧化、抑菌、抗炎活性进行了研究, 为龙胆的合理开发利用提供依据。

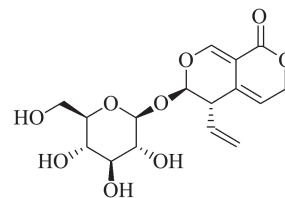


图1 龙胆苦苷的分子结构

Fig.1 Molecular structure of gentiopicroside

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

龙胆, 安徽省亳州市; 龙胆苦苷标准品 (纯度 $\geq 98\%$) 和没食子酸标准品 (纯度 $\geq 98\%$), 上海源叶生物科技有限公司; 二甲苯, 国药集团化学试剂有限公司; 三氯生、二甲基亚砷 (Dimethyl Sulfoxide, DMSO)、Griess 试剂和脂多糖 (Lipopolysaccharide, LPS), 美国 Sigma-Aldrich 公司; 糠酸莫米松乳膏, 浙江仙琚制药股份有限公司; 1,1-二苯基-2-苦肼基 (DPPH), 上海化成工业发展有限公司; 无水乙醇和甲醇, 天津市富宇精细化工有限公司; 糠秕马拉色菌 (*Malassezia furfur*, GIM2.181), 广东省微生物研究所微生物菌种保藏中心; SPF 级 KM 小鼠 [许可证号为 SYXK (粤) 2010-0102], 中山大学药学院实验动物中心; 小鼠巨噬细胞 RAW264.7 细胞株, 广东药科大学; 一氧化氮检测试剂盒, 江苏海门碧云天公司; Mouse TNF- α Elisa 试剂盒和 Mouse IL-1 α Elisa 试剂盒, 北京四正柏生物科技有限公司; 乳酸脱氢酶细胞毒性试剂盒, 江苏海门碧云天公司; AB-8 型大孔树脂, 南开大学化工厂。

1.2 仪器与设备

wi97102 打孔器, 北京若水合科技有限公司; KQ5200DE 数控超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; LC-20AT 岛津高效液相色谱仪, 日本 shimadzu 公司; SZCL-4 控温磁力搅拌器, 郑州科华仪器设备有限公司; RE-52A 真空旋转蒸发器, 上海亚荣生化仪器厂; SHB-III 循环水式多用真空泵, 郑州长城科工贸有限公司; TDL-5-A 台式大容量离心机, 上海安亭科学仪器厂; YP2002 电子天平, 上海精密仪器公司; GM-1.0A 隔膜真空泵, 天津津腾实验设备有限公司; Multiskan GO 酶标仪, 赛默飞世尔科技有限公司; YJ-875 型超净工作台, 苏州安泰空气技术有限公司; MJ80BS-II 霉菌培养箱, 上海新苗医疗器械制造有限公司; YXQ-LS-50S 立式压力蒸汽灭菌器, 上海博讯实业有限公司; MH-2 微量振荡仪, 海门市其林贝尔仪器制造有限公司; HC-1014 低速离心机, 安徽中科中佳科学仪器有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 龙胆苦苷标准曲线的测定

称取龙胆苦苷标准样品 5 mg, 用甲醇溶解并

定容于 25 mL 容量瓶中, 摇匀, 制成母液。用移液管准确吸取 1、2、3、4、5 mL 的母液于 10 mL 容量瓶中, 用甲醇定容至刻度, 摇匀, 经 0.45 μm 滤膜过滤, 制得一系列标准样品溶液。采用高效液相色谱仪进行检测, 其中色谱柱为岛津 C₁₈ 柱 (4.6 mm $\times$ 150 mm, 5 μm), 流动相为纯水: 甲醇=75:25 (V/V), 洗脱方式为等度洗脱, 流速为 1.0 mL/min, 进样量为 10 μL , 柱温为 25 $^{\circ}\text{C}$, 检测波长为 270 nm, 龙胆苦苷对应色谱峰的保留时间为 9.932 min。以龙胆苦苷质量浓度 (mg/mL) 为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y), 得到标准曲线方程: $Y=17\,238\,200X-3\,567.81$, $R^2=0.999\,987\,6$ 。龙胆苦苷标准曲线和色谱峰分别如图 2、3 所示。

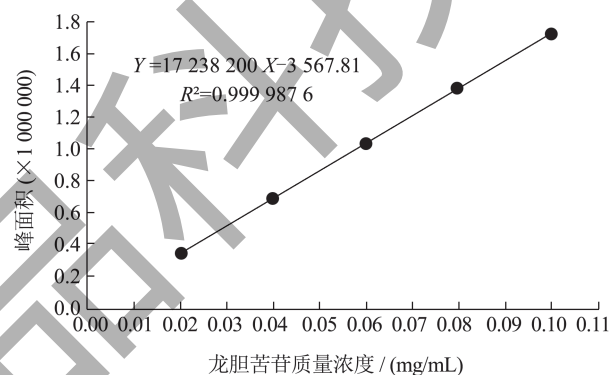


图 2 龙胆苦苷标准曲线

Fig.2 Standard curve of gentiopicroside

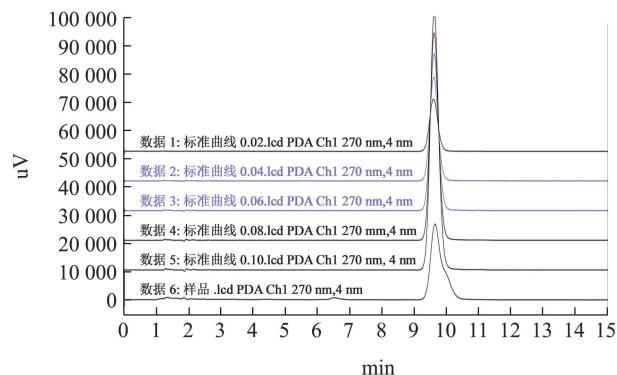


图 3 龙胆苦苷色谱峰

Fig.3 Chromatographic peak of gentiopicroside

1.3.2 龙胆苦苷提取方法

称取适量龙胆药材进行全草提取, 用纯水浸泡 30 min 后, 采用加热搅拌法进行提取, 提取液经 300 目滤布过滤, 合并滤液, 减压浓缩, 并用纯水定容得到生药材质量浓度为 0.15 g/mL 的龙胆苦苷提取液。取适量龙胆苦苷提取液, 经 0.45 μm 滤膜过滤, 采用标准曲线相同的方法测定提取液中龙胆苦苷的质量浓度。

1.3.3 龙胆苦苷纯化方法

称取适量的 AB-8 型大孔吸附树脂置于三角瓶中, 用体积分数为 95% 的乙醇浸泡过夜。采用湿法装柱, 加入体积分数为 95% 的乙醇清洗树脂, 至洗脱液与等倍量的纯水混合不浑浊为止, 再用纯水清洗至流出液无醇味, 备用。采用 AB-8 型大孔吸附树脂对龙胆苦苷提取液进行纯化, 其中, 湿树脂用量 (mL) 为药材 (g) 的 2.5 倍, 上样量为 2.67 BV, 调整适当的上样液质量浓度和上样流速, 使上样液充分吸附。先用纯水洗脱, 再用体积分数为 30% 的乙醇进行洗脱, 分别收集纯水和体积分数为 30% 的乙醇洗脱液。将体积分数为 30% 的乙醇洗脱液减压浓缩, 并用纯水定容得到生药材质量浓度为 0.20 g/mL 的龙胆苦苷纯化液。取适量龙胆苦苷纯化液, 经 0.45 μm 滤膜过滤, 采用标准曲线相同的方法测定纯化液中龙胆苦苷的质量浓度。

1.4 龙胆苦苷提取正交试验

在单因素试验的基础上^[14], 以提取温度 (A)、料液比 (B)、提取时间 (C) 和提取次数 (D) 这四个影响龙胆苦苷含量的因素为考察因素, 以龙胆苦苷提取率为考察指标, 进行 $L_9(3^4)$ 正交试验。按公式 (1) 计算龙胆苦苷提取率。

$$R = \frac{M_x}{M_y} \times 100\% \quad (1)$$

式中:

R ——龙胆苦苷提取率, %;

M_x ——各提取工艺制得的提取液中龙胆苦苷固含量, mg;

M_y ——原料中龙胆苦苷固含量, mg。

1.5 龙胆苦苷纯化单因素试验

本文分别以上样液质量浓度 (0.10、0.15、0.20 g/mL)、纯水用量、纯水洗脱流速 (1、2、3 BV/h)、解吸液用量和解吸液洗脱流速 (2、2.5、3 BV/h) 为影响因素进行单因素试验, 考察五种因素对龙胆苦苷损耗率 / 洗脱率的影响。

1.6 龙胆苦苷活性评价

1.6.1 DPPH 自由基清除试验

参考文献^[15]的方法稍作改进。

受试样品溶液的制备: 将龙胆苦苷纯化液配制成 0.20 mg/mL 的母液, 再稀释成质量浓度为 0.01、0.05、0.10 mg/mL 的受试样品溶液。

对照品溶液的制备: 用无水乙醇溶解没食子酸,

配制成与受试样品相同浓度的溶液。

精密称取 19.7 mg 的 DPPH 自由基, 加入适量无水乙醇, 制成质量浓度为 0.20 mg/mL 的 DPPH 自由基溶液。取受试样品溶液 2 mL 和 DPPH 自由基溶液 4 mL, 充分混合, 室温避光反应 30 min, 在 517 nm 处检测吸光度。无水乙醇作为空白对照, 没食子酸作为阳性对照。按公式 (2) 计算 DPPH 自由基清除率。

$$S = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100\% \quad (2)$$

式中:

S ——DPPH 自由基清除率, %;

A_1 ——受试样品溶液与 DPPH 自由基混合液的吸光度;

A_2 ——受试样品溶液与无水乙醇混合液的吸光度;

A_0 ——DPPH 自由基与无水乙醇混合液的吸光度。

1.6.2 抑菌活性试验

参考文献^[16]的方法稍作改进。

受试样品溶液的制备: 将龙胆苦苷纯化液配制成 8.00 mg/mL 的受试样品溶液。

对照品溶液的制备: 将三氯生完全溶解于 DMSO 中, 用纯水配制成 0.40 mg/mL 的对照品溶液。

菌悬液的制备: 用 1 mL 无菌水将受试菌落制成菌悬液, 用麦氏比浊管调整为 0.5 个麦氏单位, 用液体培养基将菌悬液稀释为 $1 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$ CFU/L。

采用牛津杯法进行体外抗菌活性试验。在马拉色菌固体培养基平板表面接种 100 μL 稀释好的菌悬液, 涂布均匀, 将无菌牛津杯放入培养皿中。在平皿中均匀放置 3 只牛津杯, 吸取 0.2 mL 一定质量浓度的药物溶液至牛津杯中, 马拉色菌 35 $^{\circ}\text{C}$ 培养 48~72 h, 测量抑菌圈直径, 记录数据。

进行 3 次平行试验, 根据抑菌圈大小, 初步判断细菌对药物的敏感性。抑菌效果以临床和试验室标准研究所制定的标准判定, 其中, 极敏感、高度敏感、中度敏感和低度敏感的抑菌圈直径分别为 >20 、15~20、10~15 <10 mm, “-” 为无抑菌活性。

1.6.3 巨噬细胞炎症因子分泌抑制试验

参考文献^[8,17]的方法稍作改进。

取质量浓度为 2.00、4.00、10.00 mg/mL (生药材) 的龙胆苦苷纯化液, 经 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 得到母液。将 RAW264.7 细胞分为对照组、LPS 组和龙胆苦苷不同质量浓度给药组。

采用 Griess 检测一氧化氮 (NO) 释放水平。将 RAW264.7 细胞接种于 24 孔培养板上, 每孔 1×10^6 个细胞, 给药组分别加入不同质量浓度的龙

胆苦昔溶液孵育 1 h。除对照组外，每孔加入 LPS（终质量浓度为 10.00 μg/mL）培养 24 h，收集细胞培养液。96 孔板每孔加入培养液 100 μL，再加入 Griess 试剂 100 μL，室温孵育 10 min，用酶标仪测定 540 nm 处的吸光度。

采用 ELISA 检测炎症因子（NO、TNF-α、IL-1α）释放水平。反应板经过封闭，加入对照品溶液或细胞培养液样品进行孵育，洗板后加入生物素标记抗体进行孵育，洗板后加辣根过氧化物酶标记亲和素工作液，洗板后加底物溶液，避光显色 5~15 min。每孔加入终止溶液，终止反应，用酶标仪测定 450 nm 处的吸光度。

NO、TNF-α、IL-1α 抑制率计算公式见式（3）。

$$T=\frac{M_1-M_2}{M_1-M_0}\times100\%$$

(3)

式中：

T ——炎症因子抑制率，%；

M_1 ——LPS 组炎症因子含量，NO 单位为 μmol/mL，TNF-α、IL-1α 单位为 pg/mL；

M_2 ——给药组炎症因子含量，NO 单位为 μmol/mL，TNF-α、IL-1α 单位为 pg/mL；

M_0 ——对照组炎症因子含量，NO 单位为 μmol/mL，TNF-α、IL-1α 单位为 pg/mL。

1.6.4 小鼠耳肿胀抗炎试验

参考文献^[18-20]的方法稍作改进。

受试样品凝胶的制备：将龙胆苦昔纯化液配制成 1.00 mg/g 的受试样品凝胶。

取 SPF 级 KM 小鼠 24 只，雌雄各半，随机分为阳性对照组（阳性药为糠酸莫米松乳膏）、受试样品组、空白对照组，给药剂量分别为 1.00、1.00 mg/g 和对应质量浓度等体积的生理盐水。取 10 μL 二甲苯试剂分别涂抹于小鼠右耳两侧进行致炎，左耳不进行处理，按以上给药剂量取样均匀涂抹小鼠右耳两侧。造模 1 h 后，处死小鼠，用打孔器取下左右圆耳片，于电子天平称重，记录数据，耳肿胀度和耳肿胀率计算公式见式（4）和（5）。

$$K=M_r-M_l$$

(4)

$$L=\frac{M_r-M_l}{M_l}\times100\%$$

(5)

式中：

K ——耳肿胀度，mg；

L ——耳肿胀率，%；

M_r ——右耳片质量，mg；

M_l ——左耳片质量，mg。

1.7 数据分析

用 Excel 2010 与 SPSS 20 软件进行数据统计以及显著性分析， $P<0.05$ 表示具有显著性差异。

2 结果与讨论

2.1 提取正交试验结果

经文献调研可知，康辉等^[14]对龙胆苦昔的提取工艺进行了单因素试验，结果表明，当提取温度为 80 ℃，料液比为 30，提取时间为 30 min，提取次数为 3 次时，提取液中龙胆苦昔的质量分数最高。在此基础上，本研究以提取温度（A）、料液比（B）、提取时间（C）和提取次数（D）为考察因素，建立正交试验因素水平表，见表 1。

表 1 因素水平表

Table 1 Factor level table

水平	A	B	C	D
	提取温度/℃	料液比	提取时间/h	提取次数
1	75	10	1	1
2	80	15	1.5	2
3	85	20	2	3

表 2 正交试验结果

Table 2 Results of orthogonal experiment

编号	因素				龙胆苦昔提取/%
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	33.26
2	1	2	2	2	71.54
3	1	3	3	3	83.93
4	2	1	2	3	84.99
5	2	2	3	1	59.97
6	2	3	1	2	70.00
7	3	1	3	2	73.34
8	3	2	1	3	86.76
9	3	3	2	1	69.12
K1	62.91	63.86	63.34	54.12	
K2	71.65	72.76	75.22	71.63	
K3	76.41	74.35	72.41	85.23	
R	13.50	10.49	11.88	31.11	

正交试验设计与结果见表 2。实验结果表明，各因素对龙胆苦昔提取率的影响顺序为提取次数 D>提取温度 A>提取时间 C>料液比 B。由于提取时间和料液比对活性物提取率的影响较小，综合

考虑提取率、高效性、经济性和安全性等问题，确定最佳提取工艺条件为 $A_3B_2C_1D_3$ ，即龙胆全草提取，药材中加入 15 倍药材量的纯水，浸泡 30 min，升温至 85 ℃，搅拌提取 1 h，提取 3 次。在该工艺条件下，龙胆苦苷提取率较高，达 86.76%。

经查阅文献可知，龙胆苦苷的极性较大，因而需选用极性较大的溶剂作为提取溶剂，但考虑到乙醇易挥发、易燃、价格贵，甲醇毒性大、污染严重等缺点，本研究选用纯水作为提取溶剂，通过加热搅拌法提取龙胆中的龙胆苦苷。纯水作为强极性溶剂，适用于提取苷类、多糖、有机酸盐、生物碱盐等极性大的化合物，具有安全、环保、价廉等优点。同时，采用正交试验对提取工艺进行优选，该法常用于中药提取工艺研究中，具有高效、快速、经济等优点。

2.2 提取工艺验证试验结果

以上述的最佳提取工艺条件，设置 3 组平行试验进行工艺验证。结果测得提取液中龙胆苦苷的提取率分别为 89.47%、87.63%、89.21%，平均值为 88.77%，RSD 为 1.12%，比正交试验中最高提取率（86.76%）高，表明该工艺条件具有良好的重现性。提取前的龙胆原料中龙胆苦苷纯度为 5.70%，提取后的龙胆提取液总固体中龙胆苦苷纯度为 13.34%，表明以上提取工艺具有一定的富集效果，为龙胆苦苷的生产和开发利用提供实验依据。

2.3 纯化单因素试验结果

在龙胆苦苷纯化单因素试验中，分别以上样液质量浓度（0.10、0.15、0.20 g/mL）、纯水用量、纯水洗脱流速（1、2、3 BV/h）、解吸液用量和解吸液洗脱流速（2、2.5、3 BV/h）为考察因素和考察参数进行试验。单因素试验因素和水平见表 3。

表 3 单因素试验因素水平表			
Table 3 Factor level table of single factor experiment			
考察因素	考察参数		
上样液质量浓度 (g/mL)	0.10	0.15	0.20
纯水用量 (BV)	纯水冲洗至洗脱液呈无色或接近无色，检测每 1 BV 洗脱液中龙胆苦苷含量		
纯水洗脱流速 (BV/h)	1	2	3
解吸液用量 (BV)	用 8 BV 体积分数为 30% 的乙醇洗脱，检测每 1 BV 洗脱液中龙胆苦苷含量		
解吸液洗脱流速 (BV/h)	2	2.5	3

2.3.1 上样液质量浓度对龙胆苦苷损耗率的影响

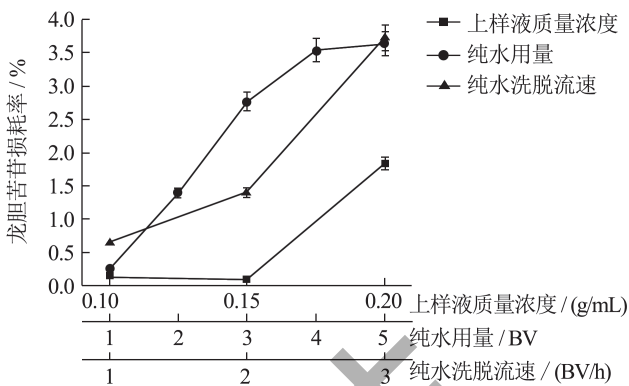


图 4 上样液质量浓度、纯水用量和纯水洗脱流速对龙胆苦苷损耗率的影响

Fig.4 Effect of mass concentration of sample solution, amount of pure water and elution velocity of pure water on the loss rate of gentiopicroside

上样液质量浓度对龙胆苦苷损耗率的影响如图 4 所示。当上样液质量浓度分别为 0.10、0.15、0.20 g/mL 时，上样废液中龙胆苦苷的损耗率分别为 0.14%、0.09%、1.83%。当上样液质量浓度为 0.20 g/mL 时，活性物损耗率明显上升，原因可能是在此质量浓度下，树脂已超出饱和和吸附量，因此继续增加上样液质量浓度将会导致更大的损耗。实验结果表明，当上样液质量浓度为 0.15 g/mL 时，龙胆苦苷的损耗率最低，因此，选择 0.15 g/mL 作为最佳上样液质量浓度。

2.3.2 纯水用量对龙胆苦苷损耗率的影响

纯水用量对龙胆苦苷损耗率的影响如图 4 所示。当纯水用量分别为 1、2、3、4、5 BV 时，纯水洗脱液中龙胆苦苷的损耗率分别为 0.23%、1.39%、2.77%、3.53%、3.64%，呈逐渐上升趋势。在纯水用量为 1~3 BV 时，活性物损耗率低，上升幅度大，而在 3~5 BV 时，损耗率高，上升幅度小，原因可能是在 1~3 BV 中，纯水去除了大部分的水溶性杂质，同时也将部分未能吸附在树脂上或吸附较弱的龙胆苦苷洗脱下来，若继续增加纯水用量将会损耗更多的活性物。实验结果表明，当纯水用量为 3~5 BV 时，龙胆苦苷的损耗率较高，因此，综合水洗除杂效果和龙胆苦苷损耗率考虑，选择 3 BV 作为最佳纯水用量。

2.3.3 纯水洗脱流速对龙胆苦苷损耗率的影响

纯水洗脱流速对龙胆苦苷损耗率的影响如图 4 所示。当纯水洗脱流速分别为 1、2、3 BV/h

时, 纯水洗脱液中龙胆苦苷的损耗率分别为 0.63%、1.39%、3.72%, 呈逐渐上升趋势。当洗脱流速为 3 BV/h 时, 活性物损耗率明显上升, 原因可能是过大的洗脱流速使树脂上的活性物吸附变弱, 从而被快速冲洗下来。实验结果表明, 当洗脱流速为 2 BV/h 时, 龙胆苦苷损耗率居中, 因此, 综合洗脱时间和龙胆苦苷损耗率考虑, 选择 2 BV/h 作为最佳纯水洗脱流速。

2.3.4 解吸液用量对龙胆苦苷洗脱率的影响

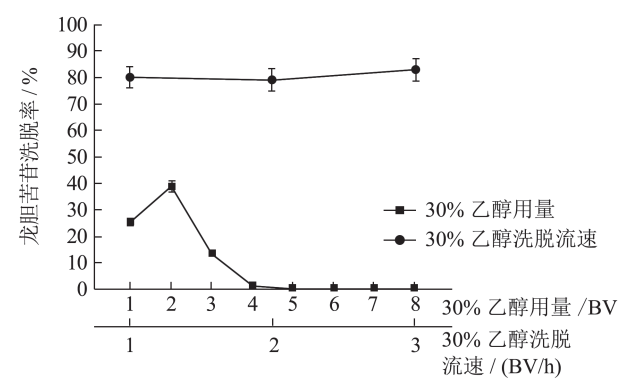


图 5 体积分数为 30% 的乙醇用量和洗脱流速对龙胆苦苷洗脱率的影响

Fig.5 Effect of 30% ethanol dosage and elution velocity on the elution rate of gentiopicroside

解吸液用量对龙胆苦苷洗脱率的影响如图 5 所示。当体积分数为 30% 的乙醇用量分别为 1、2、3、4、5、6、7、8 BV 时, 龙胆苦苷的洗脱率分别为 25.62%、38.77%、13.45%、1.21%、0.09%、0%、0%、0%。在解吸液用量为 6~8 BV 时, 活性物洗脱率为 0%, 说明大部分活性物已富集于 1~5 BV 的洗脱液中, 若继续增加解吸液用量, 会导致溶剂浪费和实验成本、洗脱时间增加。实验结果表明, 在解吸液用量为 2 BV 时, 龙胆苦苷洗脱率达到最大值, 而后逐渐下降, 因此, 综合洗脱时间和龙胆苦苷洗脱率考虑, 选择 4 BV 作为最佳解吸液用量。

2.3.5 解吸液洗脱流速对龙胆苦苷洗脱率的影响

解吸液洗脱流速对龙胆苦苷洗脱率的影响如图 5 所示。当体积分数为 30% 的乙醇洗脱流速分别为 1、2、3 BV/h 时, 龙胆苦苷的洗脱率分别为 80.13%、79.05%、82.95%。实验结果表明, 三种洗脱流速得到的洗脱率差异较小, 当洗脱流速为 3 BV/h 时, 龙胆苦苷洗脱率最高, 因此, 综合洗脱时间和龙胆苦苷洗脱率考虑, 选择 3 BV/h 作为最佳解吸液洗脱流速。

2.4 纯化工艺验证试验结果

按照优化的纯化工艺条件, 即湿树脂用量 (mL) 为药材 (g) 的 2.5 倍, 上样液质量浓度为 0.15 g/mL (生药材), 上样量为 2.67 BV, 上样流速为 1 BV/h, 纯水用量为 3 BV, 洗脱流速为 2 BV/h, 体积分数为 30% 的乙醇用量为 4 BV, 洗脱流速为 3 BV/h。设置 3 组平行试验进行工艺验证。纯化工艺验证试验结果如表 4 所示, 上样废液中龙胆苦苷的平均损耗率为 0.08%, 纯水洗脱液中龙胆苦苷的平均损耗率为 4.37%, 体积分数为 30% 的乙醇洗脱液中龙胆苦苷的平均洗脱率为 82.14%, 实验结果表明, 该工艺具有良好的重现性。纯化前的龙胆提取液总固体中龙胆苦苷纯度为 13.34%, 纯化后的龙胆洗脱液总固体中龙胆苦苷纯度为 50.63%, 表明以上纯化工艺具有较好的纯化效果, 为龙胆苦苷的生产和开发利用提供实验依据。

表 4 纯化工艺验证试验结果

Table 4 Experimental results of purification process verification (n=3)

编号	龙胆苦苷损耗率/洗脱率/%		
	上样废液	纯水洗脱液	体积分数为 30% 的乙醇洗脱液
1	0.08	4.39	81.30
2	0.09	4.42	82.68
3	0.08	4.30	82.43
平均值	0.08	4.37	82.14
RSD/%	6.93	1.43	0.90

2.5 活性试验结果

2.5.1 DPPH 自由基清除试验结果

不同质量浓度的龙胆苦苷对 DPPH 自由基的清除作用如图 6 所示。以没食子酸为阳性对照, 当受试样品质量浓度从 0.01 mg/mL 增加到 0.20 mg/mL 时, 清除率逐渐升高。当受试样品质量浓度为 0.10、0.20 mg/mL 时, 清除率与没食子酸相当, 分别为 91.49%、93.07% 和 93.36%、95.68%。实验结果表明, 龙胆苦苷对 DPPH 自由基具有良好的清除能力, 推测其具有良好的抗氧化活性。

经文献调研可知, Olennikov 等^[21]从龙胆中分离得到 137 个单体化合物, 其中包括龙胆苦苷, 并对其抗氧化活性研究发现, 龙胆苦苷的 DPPH 自由基清除效果为 <10 mg trolox/g。刘丽华^[22]对黄龙胆中的龙胆苦苷进行提取纯化, 并测得其 DPPH

自由基清除率为 90.00%，实验表明，黄龙胆中龙胆苦苷的 DPPH 自由基清除能力随龙胆苦苷浓度的增加而增大，纯化后的龙胆苦苷其清除能力比粗品和 2,6-二叔丁基-4-甲基苯酚强，但比维生素 C 弱一些。与现有研究对比，本实验表现出更好的 DPPH 自由基清除作用，原因可能是经上述对龙胆苦苷提取纯化工艺的优选，龙胆苦苷纯度提高，从而使清除作用增强，可进一步为龙胆苦苷抗氧化活性提供数据参考。

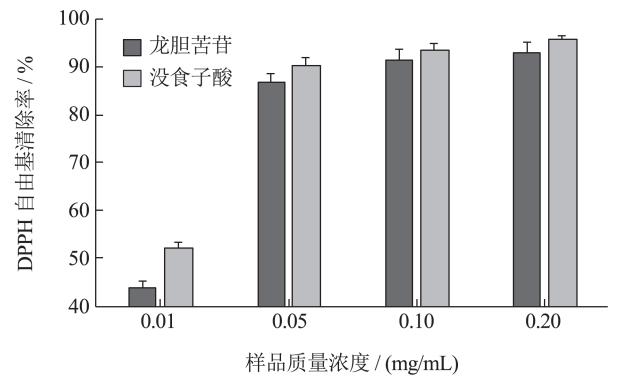


图 6 龙胆苦苷对 DPPH 自由基的清除作用
Fig.6 Scavenging rate of gentiopicroside to DPPH free radical

2.5.2 抑菌活性试验结果

表 5 龙胆苦苷对马拉色菌的抑菌圈大小
Table 5 Size of inhibitory zone of gentiopicroside against *Malassezia* (n=3)

试药	质量浓度/ (mg/mL)	抑菌圈直 径/mm	平均值/ mm	抑菌效果
龙胆苦苷溶液	8.00	15.00 ± 0.56	15.50	高度敏感
龙胆苦苷溶液	8.00	16.00 ± 0.32		
龙胆苦苷溶液	8.00	15.50 ± 0.89		
三氯生	0.40	31.00 ± 0.33	29.20	极敏感
三氯生	0.40	25.50 ± 0.74		
三氯生	0.40	31.00 ± 0.52		

龙胆苦苷对马拉色菌的抑菌作用如表 5 和图 7 所示。8.00 mg/mL 的龙胆苦苷溶液对马拉色菌的抑菌效果为高度敏感，其平均抑菌圈直径为 15.50 mm。0.40 mg/mL 的阳性对照品三氯生的抑菌效果为极敏感，平均抑菌圈直径为 29.20 mm。实验结果表明，龙胆苦苷对马拉色菌具有良好的抑制作用。

经文献调研可知，目前对于龙胆苦苷抑菌活性的研究，大多聚焦在大肠杆菌、铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌和表皮白葡萄球菌^[23,24]等菌种上，而对于马拉色菌的抑菌研究还相对欠缺，因此，本实验可进一步为龙胆苦苷抑菌活性提供数据参考。

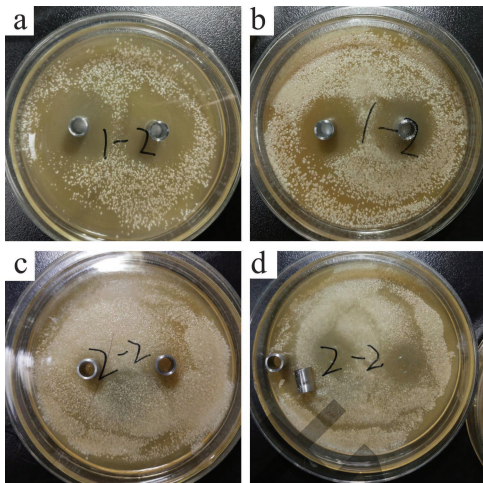


图 7 龙胆苦苷对马拉色菌的抑菌圈直径
Fig.7 Diameter of inhibitory zone of gentiopicroside against *Malassezia*

注：a 和 b 的试药为三氯生，c 和 d 的试药为龙胆苦苷溶液。

2.5.3 巨噬细胞炎症因子分泌抑制试验结果

龙胆苦苷对 LPS 刺激 RAW264.7 细胞炎症因子释放的影响如表 6 和图 8 所示。在 LPS 刺激下，RAW264.7 细胞炎症因子（NO、TNF- α 和 IL-1 α ）的释放水平升高。与 LPS 组相比，质量浓度为 2.00 mg/mL 的龙胆苦苷对 NO 和 IL-1 α 有显著的抑制作用，抑制率分别为 31.93% 和 19.24%。当质量浓度为 4.00 mg/mL 时，对 NO 和 IL-1 α 有显著的抑制作用，抑制率分别为 56.70% 和 68.17%。当质量浓度为 10.00 mg/mL 时，对 NO、TNF- α 、IL-1 α 有显著的抑制作用，抑制率分别为 97.67%、93.50%、97.03%。实验结果表明，龙胆苦苷能够显著抑制 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞炎症因子（NO、TNF- α 和 IL-1 α ）的释放。

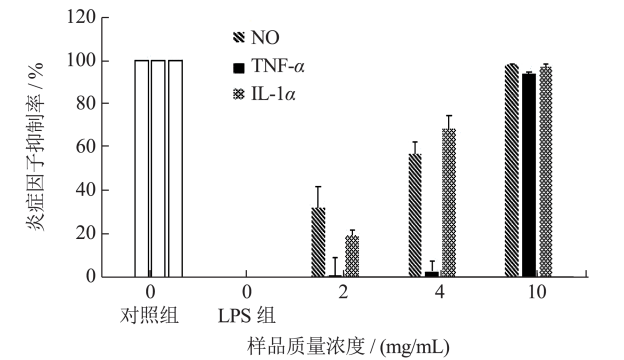


图 8 龙胆苦苷对 LPS 刺激 RAW264.7 细胞炎症因子释放的影响
Fig.8 Effect of gentiopicroside on the release of inflammatory cytokines from RAW264.7 cells stimulated by LPS

表 6 巨噬细胞炎症因子分泌抑制试验结果

Table 6 Experimental results of inhibition of secretion of macrophage inflammatory factors (n=4)							
组别	样品质量浓度/(mg/mL)	NO 抑制率/%	显著性	TNF-α 抑制率/%	显著性	IL-1α 抑制率/%	显著性
对照组	0.00	100 ± 0.00	****	100 ± 0.00	****	100 ± 0.00	****
LPS 组	0.00	0.00 ± 0.00		0.00 ± 0.00		0.00 ± 0.00	
给药组	2.00	31.93 ± 9.93	**	0.65 ± 8.41	ns	19.24 ± 2.38	**
给药组	4.00	56.70 ± 5.35	***	2.53 ± 4.95	ns	68.17 ± 6.47	****
给药组	10.00	97.67 ± 0.31	****	93.50 ± 0.95	****	97.03 ± 0.97	****

注：显著性结果中，****表示 $P<0.0001$ ；***表示 $P<0.001$ ，**表示 $P<0.01$ ，均说明与 LPS 组相比有显著性差异；ns 表示 $P>0.05$ ，说明与 LPS 组相比无显著性差异。

经文献调研可知，Deng 等^[25]研究了龙胆苦苷对 LPS 刺激 RAW264.7 细胞炎症因子释放的影响，实验表明龙胆苦苷对 NO、TNF-α 和 IL-1β 均有显著抑制作用，抑制率分别为 38.94%、78.87%、62.62%。与现有研究对比，本实验表现出更好的抑制作用，原因可能是经上述对龙胆苦苷提取纯化工艺的优选，龙胆苦苷纯度提高，从而使活性增强，可进一步为龙胆苦苷抗炎活性提供数据参考。

2.5.4 小鼠耳肿胀抗炎试验结果

龙胆苦苷对小鼠耳肿胀的抗炎效果如表 7 所示。空白组小鼠双耳的耳肿胀差异最明显，耳肿胀率为 173.87%。阳性组小鼠耳肿胀差异最小，耳肿胀率为 66.81%，表明糠酸莫米松乳膏能够显著抑制小鼠耳肿胀。受试样品组小鼠耳肿胀差异居中，耳肿胀率为 126.88%，表明受试样品能够显著抑制小鼠耳肿胀。实验结果表明，龙胆苦苷能够显著抑制小鼠耳肿胀，推测其具有良好的消肿抗炎作用。

表 7 小鼠耳肿胀抗炎试验结果

Table 7 Experimental results of ear swelling and anti-inflammatory in mice (n=8)

组别	耳肿胀度/mg	耳肿胀率/%	显著性
空白对照组	11.08 ± 5.68	173.87 ± 4.51	
阳性对照组	5.20 ± 3.42	66.81 ± 5.21	**
受试样品组	7.98 ± 2.21	126.88 ± 3.48	*

注：显著性结果中，“***”表示 $P<0.01$ ，“*”表示 $P<0.05$ ，均说明与空白对照组相比有显著性差异。

经文献调研可知，Zhang 等^[7]测定了龙胆苦苷对二甲苯致小鼠耳肿胀的体内抑制活性，实验表明龙胆苦苷具有显著的抑制效果 ($P<0.05$)，其中耳肿胀度为 8.40 mg，抑制率为 34.17%。本实验测定的是二甲苯致小鼠耳肿胀的体外抑制活性，龙胆苦苷也表现出良好的抑制效果，其中耳肿胀

度为 7.98 mg，耳肿胀率为 126.88%，抑制率为 27.03%，因此，本实验数据从体外方向进一步丰富了龙胆苦苷的抗炎活性。

3 结论

本研究以龙胆全草为原料，通过加热搅拌提取法提取龙胆苦苷，经 $L_9(3^4)$ 正交试验得到最佳提取工艺条件为：龙胆全草提取，药材中加入 15 倍药材量的纯水，浸泡 30 min，升温至 85 ℃，搅拌提取 1 h，提取 3 次。在此工艺条件下，龙胆苦苷提取率为 88.77%，提取前后的纯度分别为 5.70% 和 13.34%，表明提取工艺具有一定的富集效果。通过 AB-8 型大孔吸附树脂对龙胆提取物进行纯化，经单因素试验得到最佳纯化工艺条件为：湿树脂用量 (mL) 为药材 (g) 的 2.5 倍，上样液质量浓度为 0.15 g/mL (生药材)，上样量为 2.67 BV，上样流速为 1 BV/h，纯水用量为 3 BV，洗脱流速为 2 BV/h，体积分数为 30% 的乙醇用量为 4 BV，洗脱流速为 3 BV/h。在此条件下，龙胆苦苷洗脱率为 82.14%，纯度为 50.63%，表明纯化工艺具有较好的纯化效果。此外，活性试验表明，龙胆苦苷对 DPPH 自由基的清除率为 93.36%，其清除能力与对照品没食子酸相当。龙胆苦苷对马拉色菌的抑菌圈直径为 15.50 mm，抑菌效果为高度敏感。龙胆苦苷还能够显著抑制 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞炎症因子 (NO、TNF-α 和 IL-1α) 的释放，抑制率分别为 97.67%、93.50% 和 97.03%。龙胆苦苷对小鼠耳肿胀具有显著抑制作用，耳肿胀率为 126.88%。该研究对龙胆苦苷的提取纯化工艺进行了优化，使活性物纯度提高 8 倍左右。另外，还初步探究了龙胆苦苷的抗氧化、抑菌和抗炎活性，推测通过优化提取纯化工艺，可以提高龙胆苦苷的纯度，从而使其活

性增强。该研究表明,龙胆苦苷具有良好的抗氧化、抑菌和消肿抗炎作用,将为龙胆的合理开发利用提供重要依据。

参考文献

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[M].北京:中国医药科技出版社,2020.
- [2] 孙星衍.神农本草经[M].呼和浩特:内蒙古人民出版社,2006.
- [3] 朱橐.救荒本草校释与研究[M].北京:中医古籍出版社,2007.
- [4] KAKUDA R, IJJIMA T, YAOITA Y, et al. Triterpenoids from *Gentiana scabra* [J]. *Phytochemistry*, 2002, 59: 791-794.
- [5] 匡海学.中药化学[M].北京:中国中医药出版社,2011.
- [6] XIE X Q, LI H, WANG Y L, et al. Therapeutic effects of gentiopicroside on adjuvant-induced arthritis by inhibiting inflammation and oxidative stress in rats [J]. *International Immunopharmacology*, 2019, 76: 1-9.
- [7] ZHANG Q L, XIA P F, PENG X J, et al. Synthesis, and anti-inflammatory activities of gentiopicroside derivatives [J]. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 2022, 20(4): 309-320.
- [8] LIAN L H, WU Y L, WAN Y, et al. Anti-apoptotic activity of gentiopicroside in D-galactosamine / lipopolysaccharide-induced murine fulminant hepatic failure [J]. *Chemico-Biological Interactions*, 2010, 188(1): 127-133.
- [9] XU S, KONG F, SUN Z, et al. Hepatoprotective effect and metabonomics studies of radix gentianae in rats with acute liver injury [J]. *Pharmaceutical Biology*, 2021, 59(1): 1170-1178.
- [10] REN L, SUN D, ZHOU X, et al. Chronic treatment with the modified Longdan Xiegan Tang attenuates olanzapine-induced fatty liver in rats by regulating hepatic de novo lipogenesis and fatty acid beta-oxidation-associated gene expression mediated by SREBP-1c, PPAR-alpha and AMPK-alpha [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2019, 232: 176-187.
- [11] ZHANG Y, YANG X M, WANG S, et al. Gentiopicroside prevents alcoholic liver damage by improving mitochondrial dysfunction in the rat model [J]. *Phytotherapy Research*, 2021, 35(4): 2230-2251.
- [12] 冯苗苗,李梦含,党琳洁,等.龙胆中龙胆苦苷的提取工艺及药理活性研究进展[J].*山东化工*,2023,52(8):104-107.
- [13] 徐泽红,才谦.秦艽中裂环烯醚萜苷类成分的纯化工艺研究[J].*药物研究*,2008,5(7):28-29.
- [14] 康辉,余淑娴,郝晓霞.超声水提秦艽中龙胆苦苷的工艺优选[J].*河北工业科技*,2008,25(3):142-144.
- [15] 邱金清,胡坤霞,韩立柱,等.星点设计-效应面法优化化香树果序酚类物质的提取工艺及抗氧化分析[J].*化学研究与应用*,2022,34(6):1276-1283.
- [16] 李军,郭鸿雁,陈海燕.苦豆草提取物对马拉色菌的体外抑菌活性研究[J].*轻工科技*,2023,39(1):10-14.
- [17] 颜丽珊,邱新宇,康建英,等.天山雪莲总酚酸对脂多糖刺激的RAW264.7细胞炎症因子释放的影响及其机制研究[J].*中国现代中药*, 2023,25(10):2109-2118.
- [18] WANG S J, TONG Y, LU S, et al. Anti-inflammatory activity of myricetin isolated from *Myrica rubra* Sieb, et Zucc, leaves [J]. *Planta Med*, 2010, 76(14): 1492-1496.
- [19] WU Y H, ZHOU C X, SONG L Y, et al. Effect of total phenolics from *Laggera alata* on acute and chronic inflammation models [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2006, 108(2): 243-250.
- [20] 唐晓光,刘倩,陈晓北,等.蒙药赤爬子的提取及其镇痛抗炎作用的实验研究[J].*赤峰学院学报(自然科学版)*,2023,39(9):63-67.
- [21] OLENNIKOV D N, GADIMLI A I, ISAEV J I, et al. Caucasian *Gentiana* species: Untargeted LC-MS metabolic profiling, antioxidant and digestive enzyme inhibiting activity of six plants [J]. *Metabolites*, 2019, 9(271): 1-30.
- [22] 刘丽华.黄龙胆根有效成分的提取纯化及抗氧化研究[D].长沙:湖南农业大学,2016.
- [23] KUMARASAMY Y, NAHAR L, SARKER S D. Bioactivity of gentiopicroside from the aerial parts of *Centaurium erythraea* [J]. *Fitoterapia*, 2003, 74: 151-154.
- [24] 牛蔚露,陈恋恋,冯敏,等.三种中药单体体外对特异性皮炎优势菌群活性的影响[J].*时珍国医国药*,2022,33(2):345-348.
- [25] DENG Y T, WANG X S, ZHAO M G, et al. Gentiopicroside protects neurons from astrocyte-mediated inflammatory injuries by inhibition of nuclear factor- κ B and mitogen-activated protein kinase signaling pathways [J]. *NeuroReport*, 2018, 29(13): 1114-1120.