

正交试验优选甘草制款冬花的炮制减毒工艺

李明晓¹, 周臻^{1,2*}, 田素英^{1,2}, 林剑峰¹

(1. 广东药科大学, 广州 510006; 2. 广东省化妆品工程技术研究中心, 广东 中山 528458)

[摘要] 目的: 优选甘草制款冬花的炮制减毒工艺, 为款冬花的炮制生产工艺提供参考。方法: 以总生物碱含量为指标, 甘草水煎煮次数、烘制温度及甘草用量(甘草质量/款冬花质量)为考察因素, 采用正交试验对甘草制款冬花的减毒工艺进行优选, 考察款冬花甘草制品中有效成分含量的变化。结果: 款冬花甘草制最佳减毒工艺条件为甘草用量 10%, 水煎煮数 3 次, 烘制温度 90 ℃; 甘草制款冬花中总生物碱、款冬酮及醇浸出物质量分数分别为 0.080 3 mg·g⁻¹, 0.161%, 26.31%。结论: 与生品相比, 款冬花甘草制品中总生物碱含量显著减少, 款冬酮和醇浸出物含量增加。优选的款冬花甘草制减毒工艺稳定可行, 提示甘草汁制款冬花有一定的合理性, 具有实际应用意义。

[关键词] 款冬花; 甘草制品; 总生物碱; 款冬酮; 减毒工艺

[中图分类号] R283; R284.1; R943.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)18-0017-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016180017

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160727.1603.008.html>

[网络出版时间] 2016-07-27 16:03

Optimization of Toxicity Attenuation Processing Technology for Farfarae Flos Being Processed with Glycyrrhizae Radix et Rhizoma by Orthogonal Test

LI Ming-xiao¹, ZHOU Zhen^{1,2*}, TIAN Su-ying^{1,2}, LIN Jian-feng¹

(1. Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China;

2. Guangdong Cosmetics Engineering & Technology Research Center, Zhongshan 528458, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize toxicity attenuation processing technology of Farfarae Flos being processed with Glycyrrhizae Radix et Rhizoma. **Method:** With the content of total alkaloids as index, toxicity attenuation processing technology of Farfarae Flos being processed with Glycyrrhizae Radix et Rhizoma was optimized by orthogonal test, and contents of alcohol-soluble extract and tussilagone in Farfarae Flos were determined before and after this optimized technology. **Result:** The best processing technology was as follows: adding 10% Glycyrrhizae Radix et Rhizoma, decocted three times, baking temperature at 90 ℃. Under these conditions, average content of total alkaloids was 0.080 3 mg·g⁻¹, average content of tussilagone was 0.161%, average mass fraction of alcohol-soluble extract was 26.31%. **Conclusion:** After being processed, the content of total alkaloids in Farfarae Flos is decreased significantly, and contents of alcohol-soluble extract and tussilagone increase. This optimized processing technology is stable and feasible. This paper shows that Farfarae Flos being processed with Glycyrrhizae Radix et Rhizoma is rational.

[Key words] Farfarae Flos; processed products with Glycyrrhizae Radix et Rhizoma; total alkaloids; tussilagone; toxicity attenuation technology

[收稿日期] 20160301(005)

[基金项目] 广东药学院大学生创新创业训练计划项目(201410573004)

[第一作者] 李明晓, 从事中药炮制与制药研究, Tel: 0760-88207909, E-mail: 702181792@qq.com

[通讯作者] *周臻, 硕士, 实验师, 从事化学工程与制药工艺研究, Tel: 15899967161, E-mail: zhouzhen0802@126.com

款冬花具有润肺下气、止咳化痰的功效,用于治疗新久咳嗽、喘咳痰多、劳嗽咳血^[1],为止咳平喘方剂中的常用中药。文献报道款冬花中化学成分包括黄酮类、萜类、酚类、生物碱类、挥发油等^[2]。其中含有一类肝毒吡咯里西啶生物碱,如千里光宁、全缘千里光碱、肾形千里光碱等^[3-5]。款冬花中所含的肝毒吡咯里西啶生物碱可引起肝巨细胞症、肝细胞出血性坏死及静脉闭塞等证,使款冬花的临床使用受到一定限制^[2,5-7]。

中医认为,合适的炮制方法可减少或消除中药材的毒性及副作用,使药物能够充分发挥其疗效,保证临床用药的安全有效。款冬花的传统炮制方法主要有蜜炙法和甘草制法。2015 年版《中国药典》记载了蜜款冬花饮片^[1],蜜款冬花(蜜水炒)最早文献记载见于明代《医宗必读》,而款冬花的甘草制法则记载于较之更早的《雷公炮炙论》,明代《本草蒙筌》也有记载。款冬花蜜炙后药性温润,能增强润肺止咳的功效。甘草本身具有补脾益气、祛痰止咳、缓急止痛、清热解毒、调和诸药的功效,款冬花经甘草制后不仅能缓和药性、降低毒性,更长于增强祛痰止咳作用。现代对款冬花炮制工艺的研究报道以蜜炙为多。刘效栓等^[8]以性状、款冬酮和醇浸出物的质量分数为综合评价指标优选了蜜炙款冬花的炮制工艺;李红军等^[9]考察款冬花蜜炙前后的化学成分变化,发现蜜炙后款冬酮含量升高,克氏千里光碱含量下降;凌珊等^[10]报道了款冬花生品与蜜炙品不同溶媒提取物的镇咳、祛痰作用。款冬花的甘草制法研究则较少,王明芳等^[11]对款冬花甘草炙品与生品中总生物碱含量进行比较,发现经甘草炙后总生物碱含量有所降低。而关于甘草制款冬花的炮制减毒工艺优选及其对该药材有效成分影响的研究尚未见报道。故本实验以款冬花总生物碱含量为指标,通过正交试验优选甘草制款冬花的炮制减毒工艺,并考察该工艺对款冬花中主要有效成分款冬酮及醇浸出物含量的影响,为该药材的临床安全用药和炮制生产提供实验依据。

1 材料

UV-1000 型紫外-可见分光光度计(上海天美科学仪器有限公司),2695 型高效液相色谱仪(美国沃特世科技有限公司),XB-220A 型电子天平(普利赛斯国际贸易有限公司),GZX-9240 型电热鼓风干燥箱(上海博讯实业有限公司)。

氧化苦参碱、款冬酮对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为 110780-201007,111884-

201303),水为超纯水,甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯;款冬花(广州康圣药业有限公司,批号 20140401)和甘草(广东恒祥中药饮片有限公司,批号 20121126)经广东药科大学中药学高级实验师田素英鉴定,均符合 2015 年版《中国药典》一部相关项下的要求。

2 方法与结果

2.1 款冬花的甘草制法^[12-13] 称取一定量甘草饮片,加 10 倍水回流煎煮 45 min,滤过,同样加水量和时间再回流煎煮若干次,回收并合并滤液,浓缩至 30 mL 备用。将浓缩甘草汁倒入 100.0 g 款冬花中,拌匀,浸润 3 h 至药透汁尽,取出摊开,置烘箱中以设定温度烘干,各样品控制含水量 < 8%。

2.2 总生物碱的含量测定

2.2.1 对照品溶液的制备^[11,14] 精密称取氧化苦参碱对照品 8.0 mg,置 200 mL 量瓶中,加二氯甲烷使溶解并稀释至刻度,摇匀,即得。

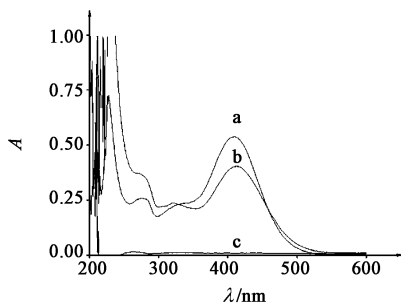
2.2.2 供试品溶液的制备^[15] 精密称取款冬花生品或炮制品粉末(过四号筛)10.0 g,置 250 mL 锥形瓶中,加入 85% 甲醇 100 mL,称定质量,超声处理 60 min,放冷,用 85% 甲醇补足减失的质量,滤过,浓缩成浸膏。加入 1 mol·L⁻¹ 盐酸溶液使溶解,超声 30 min,放冷后用石油醚脱脂 2 次(每次 10 mL)。脱脂后的酸水液加入 5% 氢氧化钠溶液调 pH 10,用二氯甲烷萃取 3 次(每次 10 mL),合并二氯甲烷液,加水洗涤,取二氯甲烷层,即得款冬花总生物碱,用二氯甲烷定容至 50 mL,得供试品溶液。

2.2.3 显色反应^[16] 分别准确吸取对照品溶液、供试品溶液各 3 mL 置于分液漏斗中,另取二氯甲烷 3 mL 于另一分液漏斗中作为空白对照。分别加入 0.05% 溴甲酚绿溶液 1.5 mL,振摇,静置。分别取二氯甲烷层于 10 mL 量瓶中,加二氯甲烷定容,30 min 内测定。

2.2.4 检测波长的选择 取经显色后的对照品溶液和供试品溶液分别于 200 ~ 600 nm 扫描,结果显示吸收波长 410 nm 时具有最大吸收,且阴性(甘草汁)样品溶液无干扰,见图 1。

2.2.5 线性关系考察 分别精密吸取氧化苦参碱对照品溶液 1.0,1.5,2.0,2.5,3.0,3.5,4.0 mL,按 2.2.3 项下方法显色,于 410 nm 处测定吸光度 A ,以质量浓度为横坐标, A 为纵坐标,得回归方程 $Y = 50.036X - 0.062$ ($r = 0.9992$),线性范围 0.004 ~ 0.016 g·L⁻¹。

2.2.6 精密度试验 取显色后的氧化苦参碱对照



a. 对照品; b. 样品; c. 甘草汁

图 1 款冬花的紫外吸收光谱

Fig. 1 Ultraviolet absorption spectrum of Farfarae Flos

品溶于 410 nm 处连续测定 6 次, 计算 A 的 RSD 0.2%, 表明仪器精密度良好。

2.2.7 重复性试验 精密称取款冬花生品粉末(过四号筛)6 份, 每份 10.0 g, 按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液, 按 2.2.3 项下方法显色, 于 410 nm 处测定 A, 计算总生物碱平均质量分数 0.114 5 mg·g⁻¹, RSD 1.4%, 表明该方法重复性良好。

2.2.8 稳定性试验 取款冬花供试品溶液, 按 2.2.3 项下方法显色, 在 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 min 于 410 nm 处分别测定 A, 计算 RSD 0.7%, 表明供试品溶液在 30 min 内稳定性良好。

2.2.9 加样回收率试验 精密称取款冬花生品粉末(过四号筛)适量, 共 6 份, 各加入氧化苦参碱对照品溶液(0.04 g·L⁻¹) 8 mL, 按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液, 按 2.2.3 项下方法显色, 于 410 nm 处测定 A, 计算氧化苦参碱的平均回收率 95.26%, RSD 1.0%。

2.3 款冬花炮制减毒工艺优选 在预试验基础上, 选择甘草水煎煮次数、烘制温度及甘草用量(甘草质量/款冬花质量)为考察因素, 每个因素选取 3 个水平。称取款冬花 9 份, 每份 100 g, 按 L₉(3⁴) 正交表安排试验, 以总生物碱质量分数为指标, 确定最佳炮制减毒工艺。试验安排及结果见表 1, 方差分析见表 2。由直观分析可知, 各因素影响款冬花甘草制工艺的排序为 A > B > C。方差分析表明因素 A 对炮制减毒工艺有显著性影响, 其他因素则均无显著性影响。综合分析, 选择款冬花甘草制减毒工艺条件 A₂B₃C₃, 即甘草用量 10%, 水煎煮 3 次, 烘制温度 90 °C。

2.4 验证试验 取显色后的款冬花生品和优选减毒工艺下炮制的甘草制品供试品溶液, 分别在 410 nm 处测定 A 并计算总生物碱含量, 见表 3。结果显示与生品相比, 款冬花甘草制品中总生物碱含量的

表 1 款冬花炮制减毒工艺正交试验分析

Table 1 Orthogonal test analysis of toxicity attenuation process of Farfarae Flos

No.	A 甘草用量 /%	B 甘草水煎煮数/次	C 烘制温度 /°C	D 空白	总生物碱质量分数 /mg·g ⁻¹
1	5	1	50	1	0.108 2
2	5	2	70	2	0.105 4
3	5	3	90	3	0.100 8
4	10	1	70	3	0.088 2
5	10	2	90	1	0.085 3
6	10	3	50	2	0.083 7
7	15	1	90	2	0.097 1
8	15	2	50	3	0.099 2
9	15	3	70	1	0.096 6

表 2 总生物碱质量分数方差分析

Table 2 Variance analysis of total alkaloids content

方差来源	SS	F	P
A	5.565 × 10 ⁻⁴	219.482	< 0.01
B	2.713 × 10 ⁻⁵	10.699	> 0.05
C	1.247 × 10 ⁻⁵	4.918	> 0.05
D(误差)	2.560 × 10 ⁻⁶		

注: F_{0.05}(2, 2) = 19, F_{0.01}(2, 2) = 99。

差异具有统计学意义, 表明经减毒工艺炮制的款冬花甘草制品中总生物碱含量明显降低。

表 3 炮制减毒工艺对款冬花总生物碱、款冬酮、醇浸出物含量的影响

Table 3 Comparison on contents of total alkaloids, tussilagone, alcohol-soluble extract in Farfarae Flos before and after being processed

No.	生品			甘草制品		
	总生物碱 /mg·g ⁻¹	款冬酮 /%	醇浸出物 /%	总生物碱 /mg·g ⁻¹	款冬酮 /%	醇浸出物 /%
1	0.114 9	0.147	23.46	0.079 5	0.162	26.71
2	0.114 5	0.146	22.39	0.080 9	0.159	27.69
3	0.114 2	0.151	23.31	0.080 2	0.162	26.86
4	0.114 5	0.149	22.97	0.080 9	0.163	25.71
5	0.115 2	0.148	24.18	0.079 9	0.158	25.15
6	0.115 8	0.146	24.51	0.080 2	0.160	25.72

2.5 款冬酮的含量测定 参照 2015 年版《中国药典》款冬花含量测定项下方法测定款冬花生品和甘草制品中款冬酮的含量^[1], 见表 3。结果表明款冬花炮制后, 款冬酮的含量较生品高。

2.6 醇浸出物含量的测定 参照 2015 年版《中国药典》款冬花浸出物项下方法对款冬花生品和甘草制品分别进行测定^[1], 每组 6 份。考虑到甘草汁可能会增加醇浸出物量, 故取甘草汁 6 份适量, 蒸发,

干燥后同法测定。按照最优减毒工艺所加甘草汁量,折算醇浸出物量平均值 0.42%。甘草制款冬花醇浸出物含量减去该平均值后所得结果见表 3。表明款冬花炮制后,醇浸出物质量分数与生品相比有所提高。

3 讨论

本文根据款冬花传统炮制方法的历史沿革,利用正交试验优化甘草制款冬花的炮制减毒工艺,并对款冬花中主要有效成分款冬酮和醇浸出物的含量进行测定,证明利用减毒工艺炮制的甘草制款冬花,总生物碱含量明显降低,款冬酮和醇浸出物与生品相比显著提高。说明款冬花传统的甘草制法有一定的科学道理。

《雷公炮炙论》有款冬花“凡用,以甘草水浸一宿”的记载^[13],但本研究发现此法可能不适用于部分南方地区气候,因款冬花经甘草汁浸泡约 5 h 即发现有酸败迹象。故本试验采用甘草汁拌匀、浸润 3 h 后烘干,以考察对款冬花的减毒作用。

研究发现款冬花中含有的肝毒吡咯里西啶生物碱会引起肝巨细胞症等^[2,5-7],是目前已知最重要的植物性肝毒成分。为此,WHO 专门针对这类生物碱制定了相关的安全指南^[17]。也有研究指出,款冬花总生物碱体内外试验均显示出明显的肝脏毒性^[6-7]。故本文采用总生物碱含量作为筛选款冬花炮制减毒工艺的指标。研究报道甘草中含有的甘草甜素、甘草次酸和甘草黄酮均可与生物碱发生沉淀,导致其溶出量减少,甘草甜素分子结构中的葡萄糖醛酸也是体内重要的解毒物质,可能会与体内含有羟基或羧基的毒物或药物结合,形成无毒或低毒的葡萄糖醛酸结合物而由尿液排出^[18-19]。甘草制款冬花与生品相比款冬酮和醇浸出物的含量增加的原因,可能是由于甘草所含皂苷类成分的增溶作用所致^[19]。

2015 年版《中国药典》收载有蜜款冬花饮片,近代款冬花炮制工艺研究以蜜炙为多见^[8]。据中医药理论,款冬花经甘草制后更长于增强祛痰止咳作用。鉴于目前对款冬花炮制减毒工艺的研究尚未见报道,故本文优化了款冬花的甘草制减毒工艺,对款冬花饮片的临床安全合理使用、炮制工艺规范和生产具有参考价值。关于款冬花经甘草制后其总生物碱含量降低、款冬酮和醇浸出物含量增加的增效减毒作用机制尚需采用药效学试验进行验证。

[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,2015:332-333.

[2] 刘可越,张铁军,高文远,等. 款冬花的化学成分及药理活性研究进展[J]. 中国中药杂志,2006,31(22):1837-1841.

[3] 曾美怡,李敏民,赵秀文. 含吡咯双烷生物碱的中草药及其毒性(二)——款冬花和伪品蜂斗菜等的毒性反应[J]. 中药新药与临床药理,1996,7(4):51-52.

[4] 濮社班,徐德然,张勉,等. 中药款冬中肝毒吡咯里西啶生物碱的 LC/MSⁿ 检测[J]. 中国天然药物,2004,2(5):293-295.

[5] 张明发,沈雅琴. 款冬花的药理毒理研究概况[J]. 中南药学,2005,3(3):165-167.

[6] 回连强,高双荣,刘婷,等. 款冬花及其总生物碱的肝脏毒性[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(4):238-241.

[7] 张燕,黄芳,吴笛,等. 款冬花及其所含生物碱对小鼠肝脏毒性作用的研究[J]. 时珍国医国药,2008,19(8):1810-1811.

[8] 刘效栓,高小恒,李喜香. 正交试验法优选蜜炙款冬花的炮制工艺[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(24):56-58.

[9] 李红军,王增绘,李文涛,等. UPLC-Q-TOF/MS 法分析款冬花蜜炙前后的化学成分变化[J]. 中国药房,2015,26(6):792-794.

[10] 凌珊,易炳学,龚千锋,等. 生品和蜜炙款冬花不同提取物的镇咳祛痰作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(11):187-190.

[11] 王明芳,李坤,孟祥龙,等. 款冬花炮制前后总生物碱含量比较[J]. 中国药事,2015,29(2):178-182.

[12] 钮正睿,毛淑杰,顾雪竹,等. 中药炮制辅料甘草汁的质量标准研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(21):100-104.

[13] 雷教. 雷公炮炙论(通解)[M]. 西安:三秦出版社,2001:263.

[14] 张丽虹,杨玉萍,陈小花,等. 酸性染料比色法测定千里光总生物碱含量[J]. 大理学院学报,2011,10(12):30-31,59.

[15] 袁谱龙,陈亮,刘小宇,等. 荷叶生物碱分离及相关活性研究[J]. 中成药,2014,36(11):2330-2333.

[16] 赵高琼,任波,张乐乐,等. 瓦布贝母茎叶和鳞茎中生物碱的对比[J]. 中成药,2013,35(8):1729-1732.

[17] Robins D J. Pyrrolizidine alkaloids[J]. Nat Prod Rep, 1995,12(4):413-418.

[18] 杨明,刘小彬,黄庆德. 附子甘草配伍减毒增效机理探析[J]. 时珍国医国药,2003,14(4):197-198.

[19] 王君,戴丽,李鹏跃,等. 芍药与甘草配伍协同增效作用的物质基础研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(11):83-86.

[责任编辑 刘德文]