

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2022.11.010

款冬花炮制方法优选*

赖岳晓¹, 刘佩沂¹, 田素英^{2,3,4△}, 雷浩强¹, 周臻^{2,3}, 黄少浩¹, 曾金玲²

(1. 广东省中山市黄圃人民医院, 广东 中山 528429; 2. 广东药科大学, 广东 广州 510006; 3. 广东省化妆品工程技术研究中心, 广东 中山 528458; 4. 广东药科大学大健康协同创新中心, 广东 中山 528458)

摘要:目的 优选款冬花的最佳炮制方法。方法 采用高效液相色谱法测定 10 个产地的款冬花生品及 4 种不同炮制品(蜜炙品、甘草炙品、甘草蜜炙品、甘草蜜复制品)中芦丁和槲皮素含量。色谱柱为 Ultimate XB-C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-0.4% 磷酸溶液(47.5:52.5, V/V), 流速为 1.0 mL/min, 检测波长为 360 nm, 柱温为 30℃, 进样量为 20 μL。采用 SPSS 11.0 统计软件对款冬花生品及 4 种不同炮制品中芦丁、槲皮素含量及芦丁和槲皮素的总含量进行分析。结果 芦丁和槲皮素的质量浓度分别在 10.002 1~501.514 3 μg/mL、0.214 0~10.700 1 μg/mL($r=0.999\ 6, 0.999\ 3, n=6$)范围内与峰面积线性关系良好; 平均加样回收率分别为 99.97% 和 99.22%, RSD 分别为 0.90% 和 2.32%($n=6$); 精密度、重复性、稳定性试验的 RSD 均小于 3.0%。与款冬花生品比较, 甘草蜜炙品、甘草蜜复制品中芦丁、槲皮素含量及芦丁和槲皮素的总含量均显著提升($P<0.05$)。结论 从芦丁、槲皮素的含量来看, 款冬花最佳炮制方法为甘草蜜复制和甘草蜜炙。

关键词: 款冬花; 炮制方法; 芦丁; 槲皮素; 高效液相色谱法

中图分类号: R932; R283

文献标志码: A

文章编号: 1006-4931(2022)11-0036-04

Optimization of Processing Method of Farfarae Flos

LAI Yuexiao¹, LIU Peiyi¹, TIAN Suying^{2,3,4△}, LEI Haoqiang¹, ZHOU Zhen^{2,3}, HUANG Shaohao¹, ZENG Jinling²

(1. Huangpu People's Hospital, Zhongshan, Guangdong, China 528429; 2. Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou, Guangdong, China 510006; 3. Guangdong Cosmetics Engineering & Technology Research Center, Zhongshan, Guangdong, China 528458; 4. Great Health Collaborative Innovation Center, Guangdong Pharmaceutical University, Zhongshan, Guangdong, China 528458)

Abstract: Objective To optimize the processing method of Farfarae Flos. **Methods** The contents of rutin and quercetin in the crude Farfarae Flos and four kinds of different processed Farfarae Flos (honeyfried processing, liquorice processing, liquorice-honeyfried processing and liquorice-honeyfried replication processing Farfarae Flos) from 10 produce areas were determined by the high-performance liquid chromatography (HPLC) method. The chromatographic column was Ultimate XB-C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was methanol-0.4% phosphoric acid solution (47.5:52.5, V/V), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 360 nm, the column temperature was 30℃ and the injection volume was 20 μL. The contents of rutin, quercetin and the sum of their contents in the crude Farfarae Flos and four kinds of different processed Farfarae Flos were analyzed by the SPSS 11.0 statistical software. **Results** The linear ranges of rutin and quercetin were 10.002 1~501.514 3 μg/mL and 0.214 0~10.700 1 μg/mL ($r=0.999\ 6, 0.999\ 3, n=6$). The average recoveries of rutin and quercetin were 99.97% and 99.22% with RSDs of 0.90% and 2.32% ($n=6$). The RSDs of precision, repeatability and stability tests were less than 3.0%. Compared with those in crude Farfarae Flos, the contents of rutin, quercetin and the sum of their contents in liquorice-honeyfried processing and liquorice-honeyfried replication processing Farfarae Flos increased significantly ($P<0.05$). **Conclusion** The optimal processing methods of Farfarae Flos are the liquorice-honeyfried processing and liquorice-honeyfried replication processing from the perspective of rutin and quercetin contents.

Key words: Farfarae Flos; processing method; rutin; quercetin; HPLC

款冬花为菊科植物款冬 *Tussilago farfara* L. 的干燥花蕾, 性温, 味辛、微苦, 归肺经, 可润肺、降气、镇咳消痰, 临床多用于治疗喘咳痰多、肺癆咳血^[1]。其主要化学成分有萜类、黄酮类、挥发油类、生物碱类、酚酸类化合物等^[2]。黄酮类化合物是镇咳、祛痰、平喘的有效成分^[3], 且抗衰老作用显著。已分离得到的黄酮类化合物主要有芦丁、金丝桃苷、山柰酚、槲皮素、番石榴苷等, 其中芦丁具有抗病毒、抗氧化、舒张血管、抗炎等活

性, 槲皮素具有保护心血管、抗氧化、抗炎、抗肿瘤等活性^[4]。本研究中建立了同时测定 10 个产地的款冬花生品及 4 种不同炮制品(蜜炙品、甘草炙品、甘草蜜炙品、甘草蜜复制品)中芦丁和槲皮素含量的高效液相色谱法, 以优选款冬花的最佳炮制方法。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

LC-16L 型高效液相色谱仪(日本岛津公司), 配有

*基金项目: 广东省中山市社会公益科技研究项目[2017B1088]。

第一作者: 赖岳晓, 男, 大学本科, 主任中药师, 研究方向为医院制剂, (电子信箱)hpylyx@126.com。

△通信作者: 田素英, 女, 硕士, 副教授, 研究方向为中药应用与教学, (电子信箱)zsqtsy@126.com。

SPD-16型紫外可见双波长检测器;ATY224型电子天平(日本岛津公司,精度为万分之一);MSA3-6P-OCE-DM型微量电子天平(德国赛多利斯集团,精度为百万分之一);HNY-300型超声波数显式清洗器(上海沪粤明科学仪器有限公司,功率为300 W,频率为50 Hz)。

1.2 试药

芦丁对照品(批号为100080-200707,纯度为98.7%),槲皮素对照品(批号为100081-200907,纯度为98.8%),均购于中国食品药品检定研究院;款冬花生品[河南洛阳(批号181128)、秦巴山区(批号为181201)、甘肃天水(批号为181123)、甘肃陇南(批号为181210)、河北邯郸(批号为181201)、内蒙古鄂尔多斯(批号为181214)、甘肃定西(批号为180510)、甘肃兰州(批号为180510)、甘肃陇西(批号为181125)、甘肃岷县(批号为181120)],均经广东药科大学田素英副教授鉴定为正品;甲醇(色谱纯,瑞典Oceanpak公司,批号为20181101);甲醇(批号为20191205),磷酸(批号为20200705),均为分析纯,购于广州化学试剂厂。

2 方法与结果

2.1 款冬花炮制方法

蜜炙:按款冬花-炼蜜(1:0.35, m/m)的比例取17.5 g炼蜜,精密称定,置50 mL烧杯中,加入8.75 mL凉开水(质量是炼蜜的0.5倍),稀释,倒入炒锅中,文火加热至沸腾,迅速熄火,倒入50 g款冬花,迅速翻动,使炼蜜均匀黏附款冬花,出锅,置带盖的不锈钢锅中,闷润3~5 h,取出,置炒锅中,小火加热炒制,使款冬花呈焦褐色,直至用手握之不成团、摸之不粘手,取出,置不锈钢托盘中,摊凉,即得蜜炙品。

甘草炙:按甘草-款冬花(1:10, m/m)的比例取50.0 g甘草饮片,置1 000 mL圆底烧瓶中,加500 mL蒸馏水,加热回流45 min,纱布滤过;同法再加入500 mL蒸馏水,回流,合并2次滤液。将滤液浓缩至500 mL,即得浓缩甘草水^[5],备用。取50.0 g款冬花,精密称定,精密量取浓缩甘草水100 mL,倒入款冬花中,拌匀,闷润3 h至药透汁尽,取出,摊开,置90℃烘箱中,直至款冬花含水量低于8%,即得甘草炙品。

甘草蜜炙:取炼蜜0.2 kg,精密称定,置1 000 mL烧杯中,加入上述浓缩甘草水0.24 kg,混匀,按蜜炙品炮制方法炮制,即得甘草蜜炙品。

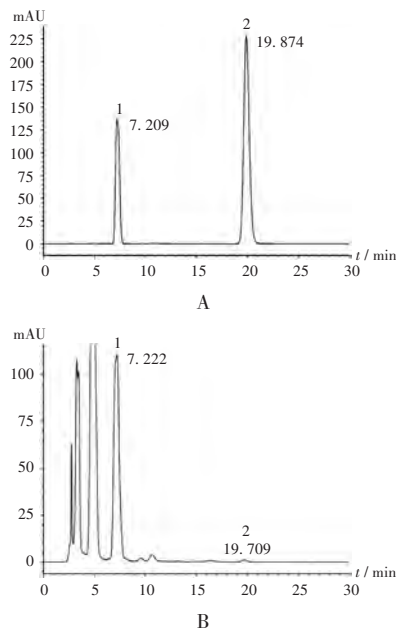
甘草蜜复制:分别按甘草炙品和蜜炙品炮制方法炮制款冬花,即得甘草蜜复制品。

2.2 含量测定

2.2.1 色谱条件与系统适用性试验^[6]

色谱柱:Ultimate XB-C₁₈柱(250 mm×4.6 mm,5 μm);
流动相:甲醇-0.4%磷酸溶液(47.5:52.5, V/V);
流速:1.0 mL/min; **检测波长:**360 nm; **柱温:**30℃; **进样**

量:20 μL。在此色谱条件下,混合对照品溶液和供试品溶液(生品)色谱图中,芦丁和槲皮素的分离度均大于1.5。色谱图见图1。



1. 芦丁 2. 槲皮素
A. 混合对照品溶液 B. 供试品溶液(生品)

图1 高效液相色谱图

1. Rutin 2. Quercetin

A. Mixed reference solution B. Test solution (crude Farfarae Flos)

Fig. 1 HPLC chromatograms

2.2.2 溶液制备

取50.152 mg芦丁对照品和1.070 mg槲皮素对照品,精密称定,加甲醇分别制成每1 mL含芦丁1.003 0 mg、槲皮素0.021 4 mg的对照品贮备液;精密量取上述对照品贮备液适量,加甲醇制成每1 mL含芦丁0.501 5 mg、槲皮素0.010 7 mg的混合对照品溶液。取4种款冬花炮制品和生品药材粗粉各1 g,分别置50 mL锥形瓶中,加入20 mL甲醇,密塞,称定质量,超声处理(功率为300 W,频率为50 Hz)60 min,放冷,称定质量,用甲醇补足减失的质量,密塞,摇匀,用0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得供试品溶液。

2.2.3 方法学考察

线性关系考察:取2.2.2项下混合对照品溶液适量,用甲醇分别稀释50倍、20倍、10倍、5倍、2倍、0倍,密塞,摇匀,制得芦丁质量浓度分别为10.002 1, 25.100 2, 50.201 2, 100.312 4, 250.801 1, 501.514 3 μg/mL,槲皮素质量浓度分别为0.214 0, 0.535 1, 1.070 1, 2.140 2, 5.350 3, 10.700 1 μg/mL的系列溶液,按2.2.1项下色谱条件进样测定,以质量浓度(X , mg/mL)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程 $Y_{\text{芦}} = 34\,200 X_{\text{芦}} + 58\,919.8$ ($r = 0.999\,6$, $n = 6$), $Y_{\text{槲}} = 79\,541.3 X_{\text{槲}} - 3\,728.42$ ($r = 0.999\,3$, $n = 6$)。结果表明,芦丁和槲皮素

的质量浓度分别在10.002 1~501.514 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和0.214 0~10.700 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验:精密量取2.2.2项下混合对照品溶液适量,按2.2.1项下色谱条件进样测定6次,记录峰面积。结果芦丁和槲皮素峰面积的RSD分别为0.25%和0.78% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

重复性试验:取款冬花生品(批号为181123)粗粉1 g,精密称定,平行6份,按2.2.2项下方法制备供试品溶液,按2.2.1项下色谱条件进样测定,每份样品测定2次。结果芦丁和槲皮素峰面积的RSD分别为2.16%和2.85% ($n=12$),表明方法重复性良好。

稳定性试验:取款冬花生品(批号为181123)粗粉1 g,精密称定,按2.2.2项下方法制备供试品溶液,0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,按2.2.1项下色谱条件分别于0, 2, 4, 8, 12, 24 h时进样测定,记录峰面积。结果芦丁和槲皮素峰面积的RSD分别为0.47%和0.35% ($n=6$),表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

加样回收试验:取已知含量的款冬花生品(批号为181123)粗粉0.5 g,平行6份,精密称定,分别按样品-芦丁(1:1, m/m)和样品-槲皮素(1:0.8, m/m)的比例加入混合对照品溶液,即得供试品溶液,按2.2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算加样回收率。结果见表1。

表1 加样回收试验结果($n=6$)

Tab. 1 Results of the recovery test ($n=6$)

成分	取样量 (g)	样品含量 (mg)	加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	$\bar{X}$ (%)	RSD (%)
芦丁	0.499 8	5.044 5	5.015 0	9.985 1	98.52	99.97	0.90
	0.500 2	5.044 8	5.015 3	10.129 0	101.37		
	0.500 1	5.044 6	5.015 2	10.065 6	100.12		
	0.499 7	5.044 5	4.034 1	9.075 5	99.92		
	0.500 1	5.044 6	4.035 0	9.076 9	99.93		
	0.500 3	5.044 8	4.035 3	9.077 6	99.94		
槲皮素	0.499 8	0.027 8	0.027 5	0.055 0	98.91	99.22	2.32
	0.500 2	0.027 9	0.027 6	0.055 0	98.19		
	0.500 1	0.027 9	0.027 8	0.055 9	100.72		
	0.499 7	0.027 8	0.027 9	0.054 4	95.34		
	0.500 1	0.027 9	0.027 5	0.055 9	101.82		
	0.500 3	0.027 9	0.027 8	0.055 8	100.36		

2.3 样品含量测定

取10个不同产地的款冬花生品和4种不同炮制品粗粉各1 g,精密称定,按2.3项下方法平行制备50份供试品溶液,按2.2项下色谱条件进样测定,每份样品测定6次,根据回归方程计算样品中芦丁和槲皮素含量。结果4种不同炮制品中芦丁和槲皮素含量之和均高于生品,且甘草蜜炙品和甘草蜜复制品中芦丁和槲皮素

含量增加均更大。详见表2。

表2 样品含量测定结果(芦丁+槲皮素, mg/g , $n=6$)

Tab. 2 Results of content determination of rutin and quercetin in the samples (rutin + quercetin, mg/g , $n=6$)

产地	批号	生品	蜜炙品	甘草炙品	甘草蜜炙品	甘草蜜复制品
甘肃定西	180510	3.33±0.01	6.38±0.02	6.79±0.04	7.40±0.05	7.43±0.05
河南洛阳	181128	3.85±0.01	4.24±0.01	4.32±0.03	4.75±0.04	4.72±0.03
甘肃天水	181123	8.88±0.06	9.39±0.08	11.77±0.09	11.93±0.10	11.98±0.11
甘肃陇西	181125	4.43±0.01	6.96±0.02	7.11±0.03	7.51±0.03	7.53±0.04
河北邯郸	181201	4.85±0.01	5.70±0.01	5.98±0.03	6.14±0.03	8.96±0.03
甘肃兰州	180510	4.69±0.02	5.21±0.03	5.45±0.03	5.74±0.04	6.86±0.04
甘肃岷县	181120	3.32±0.01	4.37±0.02	4.35±0.02	5.14±0.03	5.29±0.04
秦巴山区	181201	5.62±0.02	6.71±0.02	6.94±0.04	6.97±0.05	7.72±0.04
内蒙古鄂尔多斯	181214	6.05±0.01	7.49±0.01	7.80±0.03	7.96±0.03	8.00±0.04
甘肃陇南	181210	3.61±0.01	5.51±0.03	5.57±0.03	5.92±0.05	6.63±0.04
$\bar{X}$		4.86±0.02	6.20±0.02	6.61±0.04	6.95±0.04	7.51±0.05

采用SPSS 11.0统计学软件分别对10个不同产地款冬花生品及4种不同炮制品中的芦丁、槲皮素、芦丁和槲皮素总含量进行分析,行 t 检验。结果与款冬花生品比较,甘草蜜炙品、甘草蜜复制品中芦丁、槲皮素含量及芦丁和槲皮素总含量均显著提升($P<0.05$)。详见表3。

表3 5种样品中芦丁、槲皮素含量测定结果比较($n=10$)

Tab. 3 Comparison of content determination of rutin and quercetin in the five kinds of samples ($n=10$)

生品及炮制品	芦丁		槲皮素		芦丁+槲皮素	
	$\bar{X}\pm s$	P 值	$\bar{X}\pm s$	P 值	$\bar{X}\pm s$	P 值
生品	4.863±1.85		0.015±0.02		4.878±1.87	
蜜炙品	6.196±1.65	0.056	0.022±0.02	0.052	6.218±1.66	0.039
甘草炙品	6.608±2.49	0.097	0.034±0.01	0.006	6.642±2.50	0.011
甘草蜜炙品	6.946±1.78	0.048	0.041±0.03	0.036	6.987±1.81	0.001
甘草蜜复制品	7.512±2.05	0.045	0.042±0.02	0.003	7.554±2.05	0.003

3 讨论

甘草炙和蜜炙是款冬花的传统炮制方法^[7]。甘草水是中药炮制常用辅料,其中的甘草酸有助于款冬花中黄酮类成分析出,《历代中药炮制法汇典(古代部分)》中有甘草炙款冬花^[8]的记载。蜂蜜经炼制后,其有机酸、糖类成分含量增加,有助于黄酮类成分溶出,但款冬花蜜炙品与生品的核磁共振图谱显示两者的差异不大,提示款冬花蜜炙后不会改变其成分,而蜜炙品中款冬酮、芦丁等次级代谢产物的质量分数提高^[9]。卢紫娟^[10]采用液相色谱-质谱联用技术鉴别了款冬花生品及蜜炙品,从款冬花生品中共指认出113个化合物,且生品与炼蜜有31个共有成分,包括氨基酸类和苯丙素类化合物;从款冬花蜜炙品中共指认出121个化合物,且源于炼蜜的有12个化合物,主要为生物碱类和黄酮类,提示炼蜜可增加款冬花蜜炙品中化合物的种类和含量。薛非非等^[11]的研究