

中图分类号: R932; R283 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2023)07-0060-04
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2023.07.013



硫磺熏蒸对桔梗化学成分和药效影响的实验研究*

戴光霞¹, 葛秀允^{2△}

(1. 山东省临沂市人民医院, 山东 临沂 276003; 2. 山东医学高等专科学校, 山东 济南 250002)

摘要:目的 考察硫磺熏蒸对桔梗化学成分和药效的影响。方法 分别以硫磺熏蒸法与2020年版《中国药典(一部)》记载方法炮制桔梗饮片,采用高效液相色谱法分别测定桔梗皂苷D的含量,比较其差异;对昆明种小鼠进行氨水引咳实验及气管酚红排泄实验,分为空白对照组(等量生理盐水)、阳性药组(分别给予咳必清0.01 g/mL止咳、氯化铵5 g/L祛痰)、桔梗提取液组[给予《中国药典(一部)》法炮制桔梗饮片提取液0.5 g/mL]、硫磺熏蒸桔梗提取液组(给予硫磺熏蒸桔梗饮片提取液0.5 g/mL)、桔梗皂苷D样品组(桔梗皂苷D质量浓度为0.01 g/mL),各10只,给药体积均为每10 g体重质量0.2 mL。测定小鼠咳嗽次数和气管分泌物的酚红排泄量。结果 与桔梗饮片相比,硫磺熏蒸桔梗饮片中桔梗皂苷D含量下降约15%。与空白对照组相比,阳性药组、桔梗提取液组、桔梗皂苷D样品组小鼠的咳嗽次数均明显减少,酚红排泄量均明显增加($P < 0.05$)。与阳性药组比较,桔梗提取液组、桔梗皂苷D样品组小鼠的咳嗽次数、酚红排泄量均无显著差异($P > 0.05$)。与桔梗提取液组比较,硫磺熏蒸桔梗提取液组小鼠的咳嗽次数明显增加,酚红排泄量明显下降($P < 0.05$)。结论 硫磺熏蒸会降低桔梗中化学成分桔梗皂苷D的含量。桔梗具有明显的镇咳、祛痰作用,但经硫磺熏蒸后的镇咳、祛痰作用明显减弱,为保证临床用药安全有效,在桔梗饮片加工过程中应避免使用硫磺熏蒸。

关键词: 桔梗; 硫磺熏蒸; 高效液相色谱法; 桔梗皂苷D; 化学成分; 药效

Test Study of the Effect of Sulfur Fumigation on the Chemical Component and Pharmacological Effect of Platycodonis Radix

DAI Guangxia¹, GE Xiuyun²

(1. Linyi People's Hospital, Linyi, Shandong, China 276003; 2. Shandong Medical College, Jinan, Shandong, China 250002)

Abstract: Objective To investigate the effect of sulfur fumigation on the chemical component and pharmacological effect of Platycodonis Radix. **Methods** Platycodonis Radix Decoction Pieces were processed by the sulfur fumigation method and the method in the *Chinese Pharmacopoeia* (2020 Edition, Volume I), respectively. The content of platycodin D was determined by the high-performance liquid chromatography (HPLC) method, and the contents of platycodin D in Platycodonis Radix Decoction Pieces

*基金项目: 山东省科技发展计划项目[2014GSF119008]; 山东省中医药科技发展计划项目[2013-131, 2015-474]。

第一作者: 戴光霞, 女, 大学本科, 副主任护师, 研究方向为儿童康复保健, (电子信箱)5430516@qq.com。

△通信作者: 葛秀允, 男, 博士, 教授, 研究方向为中药炮制原理, (电子信箱)xiuyunge@163.com。

- 松大鼠模型的稳定性[J]. 中国组织工程研究, 2017, 21(20): 3164-3168.
- [8] 祁珊珊, 何佳, 郑红星, 等. 维A酸诱导的骨质疏松大鼠模型的构建及评价[J]. 中国临床药理学杂志, 2019, 35(19): 2340-2389.
- [9] TAN J, XU X, TONG Z, et al. Decreased osteogenesis of adult mesenchymal stem cells by reactive oxygen species under cyclic stretch: a possible mechanism of age related osteoporosis[J]. Bone Res, 2015, 3: 15003.
- [10] YANG YH, LI B, ZHENG XF, et al. Oxidative damage to osteoblasts can be alleviated by early autophagy through the endoplasmic reticulum stress pathway - implications for the treatment of osteoporosis[J]. Free Radic Biol Med, 2014, 77: 10-20.
- [11] 阙文君, 冯正平. 骨转换生化标志物的研究进展[J]. 中国骨质疏松杂志, 2014, 20(5): 575-579.
- [12] IKEHATA M, YAMADA A, MORIMURA N, et al. Wnt/ β -catenin signaling activates nephronectin expression in osteoblasts[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2017, 484(2): 231-234.
- [13] TAO JH, ZHAO M, JIANG S, et al. UPLC-Q-TOF/MS-based metabolic profiling comparison of four major bioactive components in normal and CKD rat plasma, urine and feces following oral administration of *Cornus officinalis* Sieb and *Rehmannia glutinosa* Libosch herb couple extract[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2018, 161(5): 254-261.
- [14] 许兵, 金红婷, 刘慧, 等. 补肾活血颗粒对去势大鼠骨组织 Wnt/ β -Catenin 通路的影响研究[J]. 中华中医药杂志, 2013, 28(11): 3400-3405.
- [15] 李涛, 吴山, 范志勇, 等. 基于 Wnt/ β -catenin 通路中医药疗法治疗骨相关疾病研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2020, 22(4): 117-121.
- [16] 葛磊. VitD 调控 Wnt/ β -catenin 信号通路对关节软骨细胞的作用机制研究[D]. 济南: 山东大学, 2019.
- [17] ZHANG R, OYAJOBIBO, HARRIS S, et al. Wnt/ β -catenin signaling cativates bone morphogenetic protein expression in osteoblasts[J]. Bone, 2013, 52(1): 145-156.

(收稿日期: 2022-05-27; 修回日期: 2022-11-10)

processed by the above two methods were compared. Kunming mice were selected for the ammonia - induced cough test and the tracheal phenol - sulfonphthalein excretion test, and divided into the blank control group (equal amount of normal saline), the positive drug group (0.01 g / mL of Kebiqing for relieving cough and 5 g / L of ammonium chloride for eliminating phlegm), the Platycodonis Radix extract group [(0.5 g / mL of extract from Platycodonis Radix Decoction Pieces processed by the method in the *Chinese Pharmacopoeia* (2020 Edition, Volume I)], the Platycodonis Radix extract group (sulfur fumigation), with 0.5 g / mL of extract from Platycodonis Radix Decoction Pieces processed by sulfur fumigation, and the platycodin D sample group (0.01 g / mL of platycodin D), with 10 mice in each group. The administration volume was 0.2 mL per 10 g body mass. The cough frequency and phenol - sulfonphthalein excretion amount of tracheal secretion of mice were measured. **Results** Compared with that in the Platycodonis Radix Decoction Pieces, the content of platycodin D in the Platycodonis Radix Decoction Pieces processed by sulfur fumigation decreased by about 15%. Compared with those in the blank control group, the cough frequency in the positive drug group, the Platycodonis Radix extract group and the platycodin D sample group decreased significantly, and the phenol - sulfonphthalein excretion amount in the positive drug group, the Platycodonis Radix extract group and the platycodin D sample group increased significantly ($P < 0.05$). The cough frequency and the phenol - sulfonphthalein excretion amount in the Platycodonis Radix extract group and platycodin D sample group were similar to those in the positive drug group ($P > 0.05$). Compared with those in the Platycodonis Radix extract group, the cough frequency in the platycodin D sample group (sulfur fumigation) increased significantly, and the phenol - sulfonphthalein excretion amount in the platycodin D sample group (sulfur fumigation) decreased significantly ($P < 0.05$). **Conclusion** Sulfur fumigation can reduce the content of platycodin D in Platycodonis Radix. Platycodonis Radix is effective in relieving cough and eliminating phlegm, but these effects are significantly weakened after sulfur fumigation. We should avoid using sulfur fumigation during the processing of Platycodonis Radix Decoction Pieces to ensure the safety and effectiveness of clinical medication.

Key words: Platycodonis Radix; sulfur fumigation; HPLC; platycodin D; chemical component; pharmacological effect

桔梗是桔梗科植物桔梗 *Platycodon grandiflorum* (Jacq.) A. DC. 的干燥根,性平,味苦、辛,气微,归肺经^[1],能升肺气,排壅肺之脓痰,治疗肺痈吐脓。现代研究表明,桔梗主要含有皂苷类化学成分,主要化学成分有桔梗皂苷D,可增强中性粒细胞的杀菌能力,提高溶菌酶活性,预防应激性溃疡。桔梗粗皂苷有镇静、镇痛、解热功效,可降低血糖,调节胆固醇,松弛平滑肌。桔梗皂苷有很强的溶血功能,因其在消化道中被分解、破坏而失去溶血作用,不宜口服^[2-6]。硫磺熏蒸为桔梗产地加工和贮藏常用方法。为考察硫磺熏蒸对桔梗化学成分和药效作用的影响,本研究中采用同来源的桔梗药材,分别按2020年版《中国药典(一部)》收载方法和硫磺熏蒸法制备样品,采用高效液相色谱(HPLC)法测定桔梗皂苷D含量,并以桔梗镇咳祛痰主要功效为指标,评价硫磺熏蒸前后桔梗的药效。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 仪器、试药与动物

仪器:LC-20AT型高效液相色谱仪(日本岛津公司);Alltech 3300型蒸发光散射检测器(美国奥泰公司);XS205DU型电子天平(梅特勒-托利多仪器有限公司,精度为十万分之一);DHG-9146A型电热恒温鼓风干燥箱(上海精宏实验设备有限公司);KDM型调温电热套(山东鄄城光明电热仪器厂);500DK-8B型水浴锅三用水箱(上海精宏电热仪器厂);UV2550型紫外分光光度计(日本岛津Shimadzu公司);TGL-20B型台式高速离心机(上海安亭科学仪器厂)。

试药:咳必清复方枸橼酸喷托维林颗粒(陕西兴邦药业有限公司,批号180604);氯化铵(无锡市亚泰联合化工有限公司,批号190501);95%乙醇、正丁醇、氨水、三氯甲

烷、甲醇均为分析纯,蒸馏水、乙腈、甲醇均为色谱纯,色谱用纯净水,硅胶(100~120目),均为市售;生理盐水(山东华鲁制药有限公司,批号G19031017);酚红(天津市科密欧化学试剂有限公司,批号20180628);桔梗皂苷D对照品(中国食品药品检定研究院,批号160804-200626,含量97.9%);桔梗鲜药材采集于山东淄博博山区,经山东省中医药研究院靳光乾主任中药师鉴定为正品。

动物:昆明种成年小鼠50只,体质量18~22 g,雌雄各半,购于山东省齐鲁医学院动物实验中心,实验动物许可证号SCXK(鲁)20090001。

1.2 方法

1.2.1 桔梗饮片制备

硫磺熏蒸法:取桔梗鲜品,自然干燥至干,洗净泥沙,润透,切厚片,硫磺熏蒸,晒干,筛去碎屑,共10批次(批号分别为2016041301, 2016041302, 2016041303, 2016041304, 2016041305, 2016041306, 2016041307, 2016041308, 2016041309, 2016041310)。

药典方法:取桔梗鲜品,自然干燥至干,洗净泥沙,润透,切厚片,晒干,筛去碎屑,共10批次(批号分别为2016031201, 2016031202, 2016031203, 2016031204, 2016031205, 2016031206, 2016031207, 2016031208, 2016031209, 2016031210)。

1.2.2 桔梗皂苷D含量测定

按2020年版《中国药典(四部)》通则0832 水分测定法^[7]和2020年版《中国药典(一部)》桔梗饮片项下含量测定方法^[1]测定1.2.1项下20批次桔梗饮片样品的水分和桔梗皂苷D含量。

1.2.3 氨水引咳实验

溶液制备:分别称取不同方法制备的桔梗饮片各

适量,置圆底烧瓶中,加入8~10倍量的蒸馏水,回流提取3次,第1次2.0 h,第2次1.5 h,第3次1.0 h,减压抽滤,合并煎液,倒入250 mL的蒸发皿中,水浴锅中浓缩,得质量浓度为0.5 g/mL的水提液,冷藏备用。取桔梗皂苷D对照品适量,精密称定,加水溶解,并定容至质量浓度为0.95 mg/mL,相当于上述水提液样品中桔梗皂苷D的质量浓度,冷藏备用,即得桔梗皂苷D供试品溶液。

分组、给药与建模:取昆明种成年小鼠50只,随机分为空白对照组(生理盐水)、阳性药组(咳必清0.01 g/mL)、桔梗提取液组(桔梗提取液质量浓度0.5 g/mL)、硫磺熏蒸桔梗提取液组(桔梗提取液质量浓度0.5 g/mL),桔梗皂苷D样品组(桔梗皂苷D质量浓度为0.01 g/mL),各10只。各组给药体积均为每10 g体质量0.2 mL。自由进食饮水,连续给药5 d,末次给药前12 h禁食不禁饮,给药1.0 h后,除空白对照组外其余各组小鼠开始浓氨水引咳实验^[8-14]。以1次小鼠腹肌强烈收缩,同时嘴张大为1次咳嗽,记录2 min内咳嗽次数。

1.2.4 小鼠气管酚红排泄实验

分组、给药:分组方法同1.2.4项下,其中阳性药对照组小鼠给予氯化铵5 g/L。各组给药体积均为每10 g体质量0.2 mL。自由进食饮水,连续给药5 d,末次给药前12 h禁食不禁饮,给药1.0 h后,除空白对照组外其余各组小鼠灌胃5%酚红生理盐水溶液,每10 g体质量0.2 mL。灌胃1.0 h后,断头处死,剪下会厌软骨至气管分支处的一段气管,置5 mL试管中,用移液枪加入2 mL生理盐水和0.1 mL 5%碳酸氢钠溶液,离心(转速3 000 r/min)30 min。

建立标准曲线:取0.05 g酚红,精密称定,置500 mL容量瓶中,加5%碳酸氢钠溶液定容,即得母液。取3.50,3.00,2.50,2.00,1.75,1.5,1.25,1.0,0.75,0.50 mL母液,分别置100 mL容量瓶中,用滴管吸取三蒸水稀释并定容。按紫外分光光度法于546 nm波长处检测光密度(OD),以质量浓度(X)为横坐标、OD(Y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程 $Y=0.1178X(R^2=0.9994,n=10)$ 。同时,取上述离心后的上清液,于546 nm波长处测定OD,计算小鼠酚红排泄量^[13-14]。

1.3 统计学处理

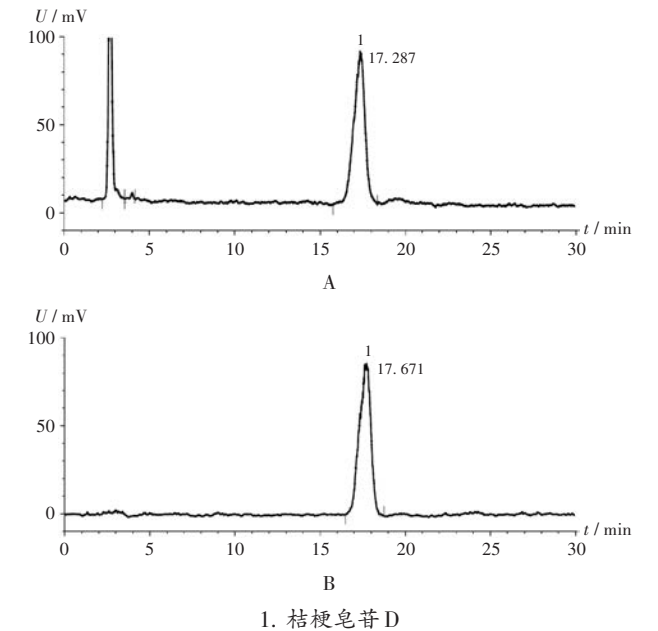
采用SPSS21.0统计学软件分析。计量资料以 $\bar{X} \pm s$ 表示,行t检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 对桔梗皂苷D含量的影响

按2种方法制备桔梗饮片,依法测定含量,结果见图1和表1。由表1可知,药典法制备的桔梗饮片的水分为5.62%~6.87%,平均 $(6.87 \pm 0.40)\%$;硫磺熏蒸法制备的桔梗饮片的含水分7.88%~8.83%;硫磺熏蒸法

制备的桔梗饮片的水分明显增加($P<0.01$)。药典法制备的桔梗饮片的桔梗皂苷D含量为0.16%~0.21%,平均 $(0.18 \pm 0.02)\%$;硫磺熏蒸法制备的桔梗饮片桔梗皂苷D含量为0.10%~0.13%,平均 $(0.12 \pm 0.11)\%$,差异显著($P<0.01$)。硫磺熏蒸后桔梗皂苷D含量降低约15%。



1. 桔梗皂苷D
A. 供试品溶液(药典法) B. 对照品溶液
图1 高效液相色谱-蒸发光散射检测器色谱图
1. Platycodin D

A. Test solution (pharmacopoeia method) B. Reference solution
Fig. 1 HPLC-ELSD chromatograms

表1 不同炮制方法桔梗饮片中桔梗皂苷D含量与水分测定结果(%)
Tab.1 Results of determination of platycodin D content and moisture in Platycodonis Radix Decoction Pieces processed by different methods (%)

炮制加工方法	批号	含量	水分	炮制加工方法	批号	含量	水分
药典法	2016031201	0.19	5.92	硫磺熏蒸法	2016041301	0.13	8.48
	2016031202	0.16	6.17		2016041402	0.11	8.34
	2016031203	0.21	6.26		2016041303	0.12	7.88
	2016031204	0.17	6.45		2016041304	0.10	8.46
	2016031205	0.18	6.53		2016041305	0.12	8.53
	2016031206	0.16	6.87		2016041306	0.11	8.72
	2016031207	0.20	6.78		2016041307	0.12	8.59
	2016031208	0.19	5.62		2016041308	0.10	8.37
	2016031209	0.17	6.51		2016041309	0.13	8.83
	2016031210	0.19	6.73		2016041310	0.11	8.36

2.2 对小鼠咳嗽次数的影响

结果见表2。与空白对照组比较,阳性药组、桔梗提取液组、桔梗皂苷D样品组小鼠咳嗽次数均显著减少($P<0.05$),硫磺熏蒸桔梗提取液组无显著差异($P>0.05$)。与阳性药组比较,桔梗提取液组、硫磺熏蒸桔梗提取液组、桔梗皂苷D样品组无显著差异($P>0.05$)。与桔梗提

取液组比较,硫磺熏蒸桔梗提取液组小鼠咳嗽次数均显著增多($P < 0.05$),表明硫磺熏蒸后镇咳作用降低。

表2 硫磺熏蒸桔梗提取液对小鼠镇咳和祛痰作用的影响
($\bar{X} \pm s, n = 6$)

Tab. 2 Effects of exact from Platycodonis Radix Decoction Pieces processed by sulfur fumigation on the cough relieving and phlegm eliminating of mice ($\bar{X} \pm s, n = 6$)

组别	咳嗽次数	酚红排泄量($\mu\text{g} / \text{mL}$)
空白对照组	18.14 $\pm$ 5.61	1.98 $\pm$ 0.70
阳性药组	14.16 $\pm$ 2.41*	2.26 $\pm$ 0.69*
桔梗提取液组	13.40 $\pm$ 2.30*	2.74 $\pm$ 0.34*
硫磺熏蒸桔梗提取液组	17.50 $\pm$ 5.94 $^{\diamond}$	2.10 $\pm$ 0.51 $^{\diamond}$
桔梗皂苷D样品组	14.76 $\pm$ 2.67*	2.34 $\pm$ 2.12*

注:与空白对照组比较,* $P < 0.05$;与桔梗提取液组比较, $^{\diamond}P < 0.05$ 。

Note: Compared with those in the blank control group, * $P < 0.05$; Compared with those in the Platycodonis Radix extract group, $^{\diamond}P < 0.05$.

2.3 对小鼠酚红排泄量的影响

结果见表2。与空白对照组比较,阳性药组、桔梗提取液组、桔梗皂苷D样品组小鼠酚红排泄量均显著增多($P < 0.05$),硫磺熏蒸桔梗提取液组无显著差异($P > 0.05$)。与阳性药组比较,桔梗提取液组、硫磺熏蒸桔梗提取液组、桔梗皂苷D样品组无显著差异($P > 0.05$)。与桔梗提取液组比较,硫磺熏蒸桔梗提取液组小鼠酚红排泄量均显著减少($P < 0.05$),表明硫磺熏蒸后祛痰作用降低。

3 讨论

关于硫磺熏蒸中药饮片对化学成分含量的影响的研究报道逐步增多。李林等^[15]通过紫外分光光度法测得熏硫卷丹中总多糖含量为0.89%,总磷脂含量为1.52%,总皂苷含量为0.131%;非熏硫卷丹中总多糖含量为1.12%,总磷脂含量为2.47%,总皂苷含量为0.197%。卢晓琳等^[16]采用HPLC法分析白芍经硫磺熏蒸后芍药苷的含量随时间的变化规律,发现不同硫磺熏蒸时间对白芍中芍药苷的影响很大,以未经硫磺熏蒸的白芍芍药苷含量最高,且随硫磺熏蒸时间的增加芍药苷含量逐渐下降。

硫磺熏蒸在中药的生产和销售中的主要作用是改善中药的颜色。在中药的储存中,还可避免中药因长时间存放受到虫蛀,影响销售。中药经过硫磺熏蒸后,保质期会大大延长,在生产和运输过程中,能避免中药变质。目前,不少中药生产厂家为了提高经济效益,存在盲目使用硫磺熏蒸的现象,导致中药经硫磺熏蒸后效果适得其反。

有研究显示,硫磺熏蒸前后中药有效成分存在差异。孟祥松等^[17]比较了经白芷的不同时间熏蒸处理的白

芷的有效成分含量,发现有效成分含量与熏蒸时间呈反比,表明白芷的作用会受到硫磺熏蒸的影响,硫磺熏蒸不仅会使白芷中有效成分含量减少,还可能会导致二氧化硫含量增加,给人体带来诸多不良反应。白芷硫磺熏蒸时间越长,残留重金属和二氧化硫越多,且不受产地和气候等因素的影响,不同产地白芷经过硫磺熏蒸后均会导致有效成分降低和有害物质增加。

综上所述,桔梗饮片硫磺熏蒸后桔梗皂苷D含量下降,与止咳化痰作用下降呈相关性。为保证临床疗效,桔梗饮片在产地加工、贮藏过程中应避免硫磺熏蒸。后续研究中将针对硫磺熏蒸是否具有毒性进行研究。

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: 289.

[2] 左 军, 尹柏坤, 胡晓阳. 桔梗化学成分及现代药理研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2019, 21(1): 113 - 116.

[3] 刘 骏, 邓 菲, 李柯静, 等. 中药桔梗及其临床配伍的研究进展[J]. 中国药业, 2014, 23(8): 84 - 86.

[4] 刘 萍, 石敏娟, 鞠东惠. 桔梗促大鼠胆汁分泌实验研究[J]. 中国药业, 2008, 17(13): 5 - 6.

[5] 拱健婷, 王大仟, 张金霞, 等. 硫磺熏蒸对当归品质影响及其替代技术研究进展[J]. 中南药学, 2018, 16(6): 793 - 798.

[6] 刘学民. 中药材经硫磺熏蒸后质量变化相关研究及对策分析[J]. 中西医结合心血管病电子杂志, 2019, 7(11): 29.

[7] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(四部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 114.

[8] 张丹参. 诱发咳嗽动物模型方法及评价[J]. 神经药理学报, 2011, 1(2): 35 - 42.

[9] 由淑萍, 刘 鑫, 艾司玛古丽·乃买提, 等. 金莲花总黄酮提取物止咳祛痰、抗炎镇痛作用的实验研究[J]. 新疆医科大学学报, 2019, 42(4): 462 - 466.

[11] 甘小锐, 苟 静, 田 徽, 等. 苦苣菜止咳化痰药效研究[J]. 亚太传统医药, 2018, 14(9): 14 - 15.

[12] 李亚玲, 张 继, 陈洪燕, 等. 松贝和青贝的镇咳、平喘、化痰和抗炎作用比较研究[J]. 中国药房, 2018, 29(11): 1520 - 1524.

[13] 高永跃, 屈相玲, 王 璞. 苗药贵州蜘蛛抱蛋镇咳抗炎作用的有效部位筛选[J]. 贵州科学, 2020, 38(5): 19 - 23.

[14] 何军伟, 朱继孝, 杨 丽, 等. 北沙参不同部位提取物镇咳祛痰作用研究[J]. 世界科学技术 - 中医药现代化, 2020, 22(8): 2864 - 2869.

[15] 李 林, 张志杰, 蔡宝昌. 硫熏对百合有效成分的影响[J]. 上海中医药大学学报, 2006, 20(1): 64 - 65.

[16] 卢晓琳, 马逾英, 张福卓, 等. 不同硫磺熏蒸程度白芷二氧化硫残留量与有效成分含量的相关性[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(9): 139 - 142.

[17] 孟祥松, 刘文革, 李 军, 等. 硫磺熏蒸时间对白芍芍药苷含量影响[J]. 安徽医药, 2010, 14(11): 1278 - 1279.

(收稿日期: 2022 - 10 - 18; 修回日期: 2022 - 12 - 14)