

中图分类号: R932; R283; R285 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2023)14-0052-07
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2023.14.012



桔梗叶醇提工艺优化及其不同部位镇咳祛痰活性研究*

孙杰^{1,2}, 赵泓瑜^{1,2}, 李小兰¹, 杨金梅¹, 王辉敏¹, 郭丽丽¹, 张朔生^{1,2,Δ}

(1. 山西中医药大学中药与食品工程学院, 山西 晋中 030619; 2. 中药炮制山西省重点实验室, 山西 晋中 030619)

摘要:目的 优化桔梗叶醇提工艺并研究其醇提物不同萃取部位的镇咳祛痰活性。方法 在单因素试验基础上,以乙醇体积分数、液料比、提取时间、提取温度为考察因素,综合评分(浸膏得率、总黄酮提取量、总皂苷提取量得分)为评价指标,采用 Box - Behnken 响应面法优化桔梗叶醇提工艺,并验证。实验设空白组[A组,等体积 0.5% 羧甲基纤维素钠(CMC - Na)],模型组(B组,等体积 0.5% CMC - Na),强力枇杷露组(C组,5.65 mL/kg),石油醚萃取部位组(D组,360 mg/kg),二氯甲烷萃取部位组(E组,6.67 mg/kg),乙酸乙酯萃取部位组(F组,228 mg/kg),正丁醇萃取部位组(G组,106 mg/kg),水萃取部位组(H组,449.54 mg/kg)。各组小鼠予相应药物或 0.5%CMC - Na 灌胃,每天 1 次,连续 7 d。以氨水引咳法复制咳嗽小鼠模型,记录小鼠引咳后 3 min 内的咳嗽次数和咳嗽潜伏期;采用酚红法测定酚红排放量;苏木素 - 伊红(HE)染色,观察小鼠肺组织病理形态。结果 桔梗叶最佳醇提工艺为,乙醇体积分数 44%,液料比 23:1(mL/g),56℃提取 2 次,每次 43 min;此条件下其浸膏得率为(29.84 ± 0.93)%,总黄酮提取量为(65.3 ± 1.93) mg/g,总皂苷提取量为(122.9 ± 4.51) mg/g,综合评分平均值为 108.68 分,与预测值接近。与 B 组比较,C - H 组小鼠的 3 min 内咳嗽次数均显著减少,咳嗽潜伏期均显著延长($P < 0.05$);C 组和 F 组小鼠的酚红排放量均显著增大($P < 0.05$),D - H 组小鼠肺泡融合和炎性细胞浸润程度减轻,其中 F 组减轻更明显。结论 优选的工艺简便可行,桔梗叶醇提物乙酸乙酯萃取部位较其他部位镇咳祛痰的功效更佳。

关键词: 桔梗叶;响应面法;醇提;工艺优化;镇咳祛痰;活性

Optimization of Ethanol Extraction Process of Platycodonis Radix Leaves and Study on the Antitussive and Expectorant Activities of Different Parts

SUN Jie^{1,2}, ZHAO Hongyu^{1,2}, LI Xiaolan¹, YANG Jinmei¹, WANG Huimin¹, GUO Lili¹, ZHANG Shuosheng^{1,2}

(1. College of Traditional Chinese Medicine and Food Engineering, Shanxi University of Chinese Medicine, Jinzhong, Shanxi, China 030619;

2. Shanxi Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Processing, Jinzhong, Shanxi, China 030619)

Abstract: Objective To optimize the ethanol extraction process of Platycodonis Radix leaves, and to study the antitussive and expectorant activities of different extraction parts of the ethanol extract. **Methods** Based on the single factor test, the ethanol extraction process of Platycodonis Radix leaves was optimized by the Box - Behnken design - response surface methodology, with the ethanol volume fraction, liquid - solid ratio, extraction time and extraction temperature as the investigation factors, and with the comprehensive score of yield of extract, extraction amount of total flavonoid and extraction amount of total saponin scores as the evaluation indicator. Then, the verification test was carried out. The mice were divided into the blank group [group A, equal volume of 0.5% carboxymethyl cellulose sodium (CMC - Na)], the model group (group B, equal volume of 0.5% CMC - Na), the Qiangli Pipa Syrup group (group C, 5.65 mL/kg), the petroleum - ether extraction part group (group D, 360 mg/kg), the dichloromethane extraction part group (group E, 6.67 mg/kg), the ethyl - acetate extraction part group (group F, 228 mg/kg), the *n* - butanol extraction part group (group G, 106 mg/kg) and the water extraction part group (group H, 449.54 mg/kg). The mice in each group were given the corresponding drugs or 0.5% CMC - Na by gavage once a day for continuous 7 d. The cough mouse models

*基金项目:山西省中医药管理局科研课题[2020ZYCC004];山西中医药大学科技创新能力培育计划项目[2021PY - ZD - 02]。

第一作者:孙杰,男,在读硕士研究生,研究方向为中药新产品开发与应用,(电子信箱)1589675501@qq.com。

Δ通信作者:张朔生,男,硕士研究生,教授,研究方向为中药炮制,(电子信箱)zhangshuosheng@aliyun.com。

Clin Lab Sci, 2020, 6: 389 - 399. 2020, 50(4): 382 - 383.

[23] TERPOS E, NTANANIS - STATHOPOULOS I, ELALAMY I, et al. Hematological findings and complications of COVID - 19[J]. Am J Hematol, 2020, 7: 834 - 847. [26] RAGAB D, SALAH ELDIN H, TAEIMAH M, et al. The COVID - 19 Cytokine Storm; What We Know So Far[J]. Front Immunol, 2020, 11: 1446.

[24] CHEN G, WU D, GUO W, et al. Clinical and immunological features of severe and moderate coronavirus disease 2019[J]. J Clin Invest, 2020, 130(5): 2620 - 2629. [27] ZHANG C, WU Z, LI JW, et al. Cytokine release syndrome in severe COVID - 19: interleukin - 6 receptor antagonist tocilizumab may be the key to reduce mortality [J]. Int J Antimicrob Agents, 2020, 55(5): 105954.

[25] ULHAQ ZS, SORAYA GV. Interleukin - 6 as a potential biomarker of COVID - 19 progression [J]. Med Mal Infect, (收稿日期:2022 - 10 - 09;修回日期:2023 - 03 - 03)

were replicated by the ammonia-induced cough method, the cough frequency and cough latency within 3 min after inducing cough were recorded. The excretion of phenolsulfonphthalein (PSP) was determined by the PSP excretion test. The pathological morphology of lung tissue in mice was observed by the hematoxylin-eosin (HE) staining. **Results** The optimal ethanol extraction process of *Platycodonis Radix* leaves was as follows: the ethanol volume fraction was 44%, the liquid-solid ratio was 23:1 (mL/g), extracting twice at 56 °C, each time for 43 min. Under these conditions, the yield of extract was (29.84 ± 0.93)%, the extraction amount of total flavonoids was (65.3 ± 1.93) mg/g, the extraction amount of total saponins was (122.9 ± 4.51) mg/g, the average comprehensive score was 108.68 points, which was similar to the predicted value. Compared with those in the group B, the cough frequency within 3 min in the groups C-H significantly reduced, and the cough latency significantly prolonged ($P < 0.05$). Compared with those in the group B, the excretion of PSP in the groups C and F significantly increased ($P < 0.05$). Compared with those in the group B, the degree of alveolus fusion and inflammatory cell infiltration in the groups D-H alleviated, and those in the group F changed more significantly. **Conclusion** The optimal process is simple and feasible, and the ethyl-acetate extraction part of the ethanol extract of *Platycodonis Radix* leaves has more obvious antitussive and expectorant effects compared with other parts.

Key words: *Platycodonis Radix* leaves; response surface methodology; ethanol extraction; process optimization; antitussive and expectorant; activity

桔梗为桔梗科植物桔梗 *Platycodon grandiflorum* (Jacq.) A. DC. 的干燥根, 为历史悠久的药食两用中药材, 具有宣肺祛痰、利咽排脓等功效, 在我国分布广泛^[1]。近几年, 随着研究的逐步深入, 中药传统非药用部位的价值逐渐被认识, 植物桔梗的地上部位也得到了关注。有研究表明, 桔梗叶中含有与其根部类似的黄酮类、皂苷类和多糖类等活性成分^[2-4], 从中已鉴定出10余种皂苷类^[5-6]、20余种黄酮类^[5-7]、2种多糖类^[5]成分。还有研究表明, 桔梗叶中的黄酮类成分含量显著高于根部^[8]。此外, 桔梗叶的抗抑郁^[9]、抗氧化^[10]、抗肿瘤^[11]、抗炎^[12]等功效也被证实, 但这些活性作用所归属的化学成分尚待明确。桔梗可通过调节亚油酸、花生四烯酸、甘油磷脂等物质的代谢过程而发挥镇咳、祛痰作用^[13], 桔梗地上部位亦有这些作用^[14], 但其活性物质尚不明确。本研究中以单因素试验结合 Box-Behnken 试验优化桔梗叶活性成分的醇提工艺, 并对醇提物的不同萃取部位进行镇咳、祛痰活性评价, 以期明确桔梗叶镇咳、祛痰的主要活性部位, 为后续深入揭示其物质基础奠定理论依据。现报道如下。

1 仪器、试药与动物

1.1 仪器

SB25-12D型超声波清洗机(宁波新芝生物科技股份有限公司); DE-500g型多功能粉碎机(浙江红景天工贸有限公司); AR223CN型电子分析天平(奥豪斯仪器<上海>有限公司); RE-2000B型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂); Ultra-3000型紫外-可见分光光度计(北京普源精电科技有限公司); SynergyHTX型多功能酶标仪(美国Bio Tek公司); NIKON Eclipse Ci型正置显微镜(尼康仪器<上海>有限公司)。

1.2 试药

芦丁对照品(上海源叶生物科技有限公司, 批号为H17M9Z61362), 桔梗皂苷D对照品(上海融禾医药科技有限公司, 批号为210509), 含量均大于98.0%; 强力枇杷露(广西维威制药有限公司, 批号为210203, 规格为每瓶180 mL); 浓氨水(天津市大茂化学试剂厂, 批号为20220502); 苯酚红(上海麦克林生化科技有限公司, 批号为C13942464); 4%多聚甲醛固定液(武汉博士德生物工程有限公司, 批号为16H01A68); 其余试剂均为分析纯, 水为蒸馏水。桔梗叶(采自山西省运城市新绛县阳王镇刘域村), 经山西中医药大学中药学院张朔生教授鉴定为正品。

1.3 动物

SPF级KM小鼠, 体质量(18 ± 2) g, 雌雄各半, 均购自北京斯贝福生物技术有限公司, 实验动物生产许可证号SCXK(京)2019-0010。动物实验经山西中医药大学医学伦理委员会批准(批准号AWE20221209)。

2 方法与结果

2.1 浸膏得率测定

提取桔梗叶后, 记录所得提取液总体积(V , mL)。先测定10 mL提取液所得浸膏量, 再根据下列公式换算成提取液总体积的浸膏量。浸膏得率(%) = $[(m_2 - m_1) / 10 \times V] / m \times 100\%$ 。式中, m_2 (g)为恒重后浸膏和蒸发皿的质量, m_1 (g)为恒重后蒸发皿的质量, m (g)为称取的药材质量(5 g)。

2.2 总黄酮、总皂苷含量测定

以芦丁为对照品, 采用亚硝酸钠-硝酸铝法^[8], 于510 nm波长处测定吸光度, 以总黄酮质量浓度(X , $\mu\text{g}/\text{mL}$)为横坐标, 吸光度值(Y)为纵坐标进行线性回归, 得回归方程 $Y_1 = 0.0133X_1 + 0.0395$ ($R^2 = 0.9992$), 取1 mL

提取液,同法显色,计算总黄酮含量。以桔梗皂苷D为对照品,采用香草醛-高氯酸法^[15],于475 nm波长处测定吸光度,以总皂苷质量浓度($X, \mu\text{g} / \text{mL}$)为横坐标,吸光度值(Y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程 $Y_2 = 0.0063X_2 + 0.0289 (R^2 = 0.9992)$ 。取1 mL提取液,同法显色,计算总皂苷含量。

2.3 单因素试验

以桔梗叶为原料,以浸膏得率、总黄酮含量、总皂苷含量及三者的综合评分为评价指标,考察乙醇体积分数、液料比、提取时间、提取温度4个因素对醇提工艺的影响。提取的固定条件为超声功率500 W、提取2次。设浸膏得率、总黄酮含量、总皂苷含量所占权重分别为40,30,30,综合评分 = $40 \times \text{浸膏得率} / \text{各水平浸膏得率平均值} + 30 \times \text{总黄酮含量} / \text{各水平中总黄酮含量平均值} + 30 \times \text{总皂苷含量} / \text{各水平中总皂苷含量平均值}$ 。

乙醇体积分数:随着乙醇体积分数的升高,桔梗叶中各成分提取量及浸膏得率均总体上升,当乙醇体积分数为40%时,综合评分最高,故乙醇体积分数选择40%。详见表1。

表1 不同乙醇体积分数对提取效果的影响($\bar{X} \pm s$)

Tab. 1 Effect of ethanol with different volume fractions on the extraction results ($\bar{X} \pm s$)

乙醇体积分数(%)	浸膏得率(%)	总黄酮提取量(mg/g)	总皂苷提取量(mg/g)	综合评分
30	23.03 ± 0.40	41.96 ± 2.37	93.15 ± 5.56	98.62 ± 3.10
40	23.50 ± 0.32	47.72 ± 3.09	104.34 ± 5.21	106.47 ± 0.48
50	21.90 ± 0.64	46.23 ± 0.33	109.27 ± 2.36	103.69 ± 1.16
60	20.40 ± 2.41	45.58 ± 0.44	99.37 ± 3.20	99.45 ± 2.17
70	18.59 ± 1.81	41.45 ± 0.73	111.33 ± 2.62	94.94 ± 3.51

液料比:随着液料比的逐渐增加,桔梗叶中各成分的提取量及浸膏得率均总体呈上升,当液料比超过20:1 (mL/g,下同)后,上述指标变化趋于平缓,综合评分的变化幅度也较小,故液料比选择20:1。详见表2。

表2 不同液料比对提取效果的影响($\bar{X} \pm s$)

Tab. 2 Effect of different liquid - solid ratios on the extraction results ($\bar{X} \pm s$)

液料比(mL/g)	浸膏得率(%)	总黄酮提取量(mg/g)	总皂苷提取量(mg/g)	综合评分
10:1	21.96 ± 0.45	43.14 ± 1.41	98.26 ± 2.09	80.32 ± 1.57
15:1	25.68 ± 0.39	55.12 ± 2.10	130.45 ± 2.42	99.93 ± 1.10
20:1	27.42 ± 0.38	59.65 ± 3.45	135.26 ± 1.96	106.17 ± 2.92
25:1	27.07 ± 0.42	62.21 ± 2.44	133.13 ± 4.39	105.51 ± 1.54
30:1	27.76 ± 1.82	56.01 ± 0.47	140.28 ± 1.01	105.75 ± 3.04

提取时间:随着提取时间的延长,桔梗叶中各成分的提取量及综合评分均总体上升,在40 min时综合评分最高,此后继续延长提取时间,上述指标也无明显变化,故提取时间选择40 min。详见表3。

表3 不同提取时间对提取效果的影响($\bar{X} \pm s$)

Tab. 3 Effect of different extraction time on the extraction results ($\bar{X} \pm s$)

提取时间(min)	浸膏得率(%)	总黄酮提取量(mg/g)	总皂苷提取量(mg/g)	综合评分
20	25.36 ± 0.54	57.75 ± 1.51	109.54 ± 4.60	91.74 ± 0.20
30	26.40 ± 0.30	59.05 ± 0.48	106.78 ± 2.26	101.13 ± 0.58
40	26.71 ± 0.06	63.97 ± 1.29	136.06 ± 0.72	104.25 ± 0.69
50	26.07 ± 0.56	60.30 ± 1.52	133.59 ± 1.48	101.46 ± 1.20
60	26.77 ± 0.44	60.49 ± 1.94	135.48 ± 0.61	102.48 ± 1.01

提取温度:随着提取温度的升高,桔梗叶中各成分的提取量及浸膏得率均总体升高,综合评分在60℃时最高,故提取温度选择60℃。详见表4。

表4 不同提取温度对提取效果影响($\bar{X} \pm s$)

Tab. 4 Effect of different extraction temperatures on the extraction results ($\bar{X} \pm s$)

提取温度(℃)	浸膏得率(%)	总黄酮提取量(mg/g)	总皂苷提取量(mg/g)	综合评分
30	23.96 ± 1.00	45.54 ± 1.28	94.32 ± 4.07	89.47 ± 2.47
40	25.96 ± 0.91	48.77 ± 1.64	104.57 ± 7.34	97.22 ± 3.31
50	26.36 ± 0.40	51.30 ± 0.35	110.86 ± 5.69	98.34 ± 2.26
60	26.17 ± 0.24	65.67 ± 3.03	100.61 ± 3.36	106.46 ± 2.49
70	26.15 ± 1.25	49.21 ± 0.59	112.20 ± 5.46	97.08 ± 3.60

2.4 Box - Behnken 试验

试验设计:在单因素试验基础上,以乙醇体积分数(因素A)、液料比(因素B)、提取时间(因素C)、提取温度(因素D)为考察因素,以综合评分(Y)为评价指标,采用响应面法确定最优醇提工艺。因素与水平见表5。试验设计与结果见表6。

表5 因素与水平

Tab. 5 Factors and their levels

水平	因素A(%)	因素B(mL/g)	因素C(min)	因素D(℃)
-1	30	15:1	30	50
0	40	20:1	40	60
1	50	25:1	50	70

模型拟合:采用 Design - Expert V8.0.6.1 软件对试验数据进行分析,得回归方程 $Y = 106.95 + 0.012A + 3.83B - 0.064C - 1.00D + 4.45AB + 1.28AC - 2.72AD + 2.70BC + 0.11BD - 1.82CD - 4.62A^2 - 6.05B^2 - 5.75C^2 - 0.51D^2$ 。

方差分析:将模型的回归参数进行方差分析,结果见表7。回归模型为极显著水平($P < 0.0001$),失拟项不显著($P > 0.05$),模型的决定系数(R^2)为0.9599,调整决定系数(R^2_{Adj})为0.9199,说明可解释91.99%的响应值变化,表明模型成立。该模型的显著性检验显示,一次项B,交互项AB,AD,BC,平方项 A^2, B^2, C^2 的影响均达极显著水平($P < 0.01$),一次项D、交互项CD的影响达显著水平($P < 0.05$)。各因素对响应值的影响不

表6 Box - Behnken 试验设计与结果

Tab. 6 Design and results of Box - Behnken test

序号	因素				浸膏得率 (%)	总黄酮提取量 (mg/g)	总皂苷提取量 (mg/g)	综合评分
	A	B	C	D				
1	-1	-1	0	0	24.30	57.44	92.46	96.05
2	1	-1	0	0	20.40	58.00	87.30	88.51
3	-1	1	0	0	28.20	51.69	74.15	93.62
4	1	1	0	0	24.90	57.36	114.41	103.89
5	0	0	-1	-1	25.44	63.46	86.25	98.97
6	0	0	1	-1	24.79	54.51	119.40	103.88
7	0	0	-1	1	25.68	60.60	91.63	99.54
8	0	0	1	1	25.33	64.70	79.40	97.16
9	-1	0	0	-1	27.49	49.79	98.30	99.17
10	1	0	0	-1	24.58	62.40	108.60	104.04
11	-1	0	0	1	28.00	61.20	98.00	105.52
12	1	0	0	1	25.99	57.00	95.70	99.52
13	0	-1	-1	0	24.30	57.60	88.00	94.72
14	0	1	-1	0	25.40	62.90	82.50	97.34
15	0	-1	1	0	22.86	60.20	69.70	87.95
16	0	1	1	0	25.67	69.50	83.70	101.39
17	-1	0	-1	0	25.44	63.46	86.25	98.87
18	1	0	-1	0	23.12	66.20	83.20	95.58
19	-1	0	1	0	25.42	56.13	88.80	96.02
20	1	0	1	0	24.07	59.60	95.97	97.85
21	0	-1	0	-1	23.85	53.31	103.55	98.69
22	0	1	0	-1	26.77	60.10	110.50	106.98
23	0	-1	0	1	23.70	65.90	77.80	94.64
24	0	1	0	1	24.40	69.63	97.40	103.36
25	0	0	0	0	27.50	62.20	104.90	107.39
26	0	0	0	0	26.47	64.30	109.10	108.12
27	0	0	0	0	26.30	66.40	99.30	105.80
28	0	0	0	0	25.90	67.80	104.90	107.62
29	0	0	0	0	25.04	67.00	104.80	105.83

同,对综合评分影响大小顺序为B > D > C > A。

响应面预测:利用 Design - Expert 软件分析回归方程,得各因素交互影响桔梗叶综合评分的三维响应面图^[16](见图1)。可见,因素A与B、A与D、B与C、C与D交互作用显著,表明两者交互作用对综合评分影响程度大,与方差分析结果一致。

2.5 醇提工艺验证

经软件预测,桔梗叶最佳醇提工艺为乙醇体积分数44.2%、液料比22.8:1、提取时间42.81 min、提取温度55.68℃。综合评分为108.567分。考虑到实际操作的可行性,将最佳工艺条件确定为乙醇体积分数44%、提取温度56℃、液料比23:1、提取2次,每次43 min,进行3次平行验证试验,此条件下其浸膏得率为(29.84 ± 0.93)%、

表7 Box - Behnken 试验回归模型方差分析结果

Tab. 7 Results of ANOVA of regression model of Box - Behnken test

方差来源	离差平方和	自由度	均方差	F值	P值
模型	802.13	14	57.30	23.96	<0.0001
A	1.633 × 10 ⁻³	1	1.633 × 10 ⁻³	6.831 × 10 ⁻⁴	0.9795
B	176.49	1	176.49	73.81	<0.0001
C	0.049	1	0.049	0.021	0.8877
D	11.98	1	11.98	5.01	0.0420
AB	79.30	1	79.30	33.16	<0.0001
AC	6.55	1	6.55	2.74	0.12
AD	29.54	1	29.54	12.35	0.0034
BC	29.27	1	29.27	12.24	0.0035
BD	0.046	1	0.046	0.019	0.8914
CD	13.29	1	13.29	5.56	0.0335
A ²	138.20	1	138.20	57.80	<0.0001
B ²	237.69	1	237.69	99.41	<0.0001
C ²	217.24	1	217.24	90.85	<0.0001
D ²	1.70	1	1.70	0.71	0.4131
残差	33.47	14	2.39		
失拟项	28.87	10	2.89	2.51	0.1984
纯误差	4.61	4	1.15		
总和	835.61	28			

总黄酮提取量为(65.3 ± 1.93) mg/g,总皂苷提取量为(122.9 ± 4.51) mg/g。综合评分的平均值为108.682分,与预测值接近。

2.6 镇咳、祛痰活性测定

桔梗叶醇提物萃取部位制备:取210 g桔梗叶粉末,按最佳工艺提取,合并溶液,回收乙醇浓缩得浸膏(62 g),按液料比20:1溶于水中,分别用不同极性溶剂等体积萃取3次,减压回收溶剂,于60℃干燥至恒重,计算浸膏得率。依次得到石油醚(23.76%)、二氯甲烷(0.44%)、乙酸乙酯(15.04%)、正丁醇(6.99%)和水(29.64%)萃取部位。

分组与给药:将80只KM小鼠随机分为空白组(A组,等体积0.5%CMC - Na),模型组(B组,等体积0.5%CMC - Na),强力枇杷露组(C组,5.65 mL/kg),石油醚萃取部位组(D组,360 mg/kg),二氯甲烷萃取部位组(E组,6.67 mg/kg),乙酸乙酯萃取部位组(F组,228 mg/kg),正丁醇萃取部位组(G组,106 mg/kg),水萃取部位组(H组,449.54 mg/kg),各10只。各组小鼠给予灌胃0.5%CMC - Na或药物,每天1次,连续7 d。给药剂量依据,以D组为例,将桔梗叶每日用量设为10 g(参考桔梗的每日临床用量),石油醚萃取部位得率为23.76%,故D组的给药量为360 mg/kg(10 × 9.1 × 23.76% / 60 kg)。

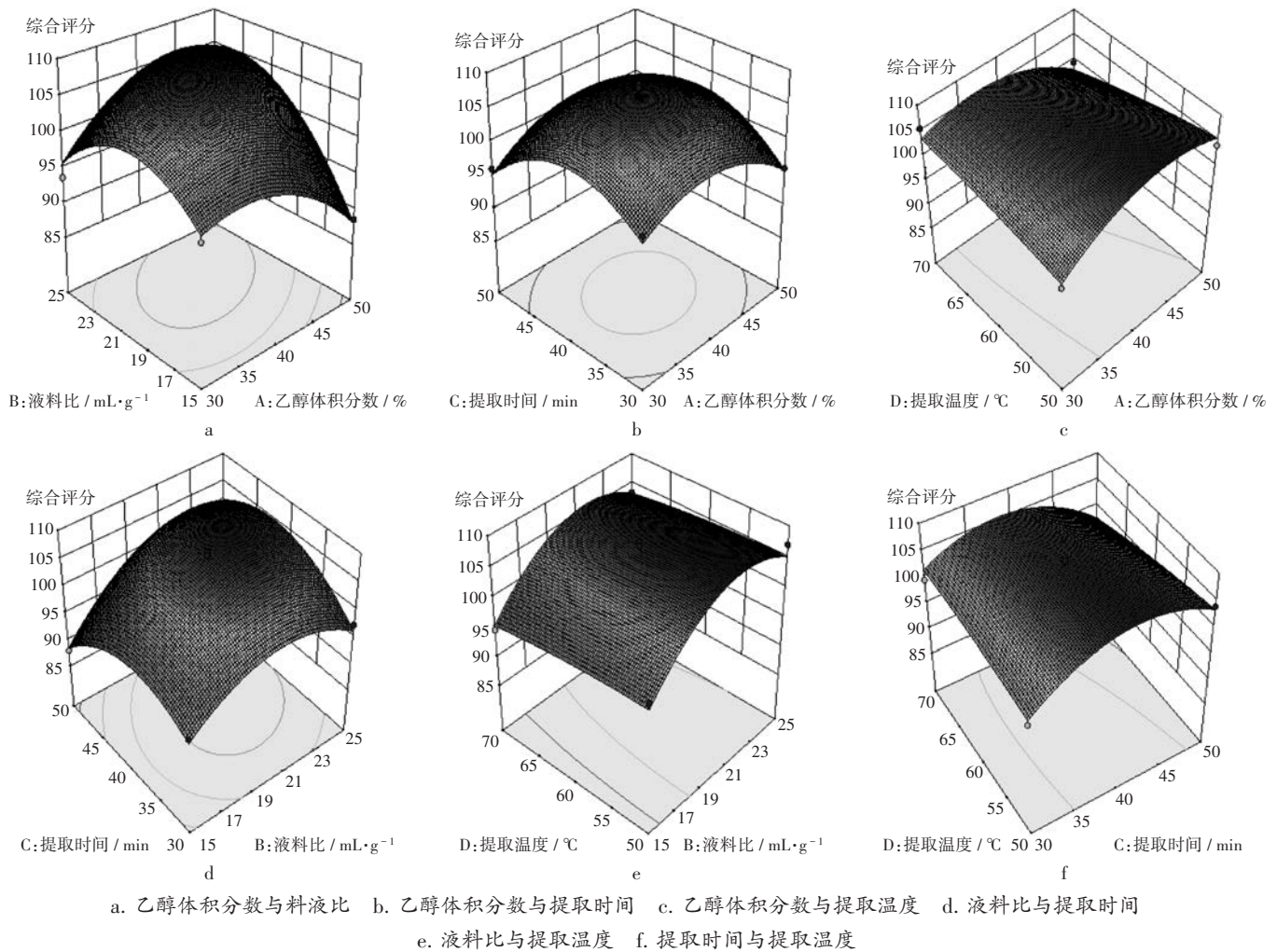


图1 各试验因素交互作用的响应面图

a. Ethanol volume fraction and liquid-solid ratio b. Ethanol volume fraction and extraction time c. Ethanol volume fraction and extraction temperature
d. Liquid-solid ratio and extraction time e. Liquid-solid ratio and extraction temperature f. Extraction time and extraction temperature

Fig. 1 Response surface diagrams of the interaction of various factors

镇咳实验:参照文献[17],在倒扣的500 mL烧杯中放入1个质量为0.5 g的棉球,随后注入300 μ L氨水,饱和1 min后迅速将末次给药30 min后的小鼠放入其中,45 s后取出,放于另一个倒扣的干净烧杯中,记录小鼠引咳后3 min内的咳嗽次数和咳嗽潜伏期(超过3 min以3 min计)。采用GraphPadPrism 8.0.2软件软件处理数据(下同)。结果,与B组比较,C-H组小鼠3 min内咳嗽次数均显著减少,咳嗽潜伏期均显著延长($P < 0.01$)。详见表8。

祛痰实验:1)酚红排泄量。末次给药30 min后,小鼠腹腔注射酚红溶液。取小鼠气管,将其置于生理盐水与NaHCO₃混合液中浸泡过夜,后以3 000 r/min离心15 min,取上清液。于560 nm波长处测定吸光度值,计算酚红排泄量[18]。结果,与B组比较,C组、F组小鼠酚红排泄量显著增加($P < 0.01$)。详见表9。2)肺部组织病理形态。处死小鼠后,将其置冰台上固定,剪去肺脏,

表8 各组小鼠的咳嗽次数及潜伏期比较($n = 10$)

Tab. 8 Comparison of cough frequency and cough latency in each group ($n = 10$)

组别	剂量(mg/kg)	咳嗽潜伏期($\bar{X} \pm s, s$)	咳嗽次数($\bar{X} \pm s$)
A组		180.00 \pm 0.00	0
B组		16.00 \pm 3.24 [#]	48.20 \pm 2.78 [#]
C组	15.1	37.20 \pm 2.78 ^{**}	12.60 \pm 1.52 ^{**}
D组	360	31.80 \pm 3.35 ^{**}	15.40 \pm 4.34 ^{**}
E组	6.67	33.40 \pm 5.13 ^{**}	19.80 \pm 1.79 ^{**}
F组	228	43.60 \pm 4.04 ^{**}	15.60 \pm 2.19 ^{**}
G组	106	38.80 \pm 5.07 ^{**}	20.60 \pm 1.52 ^{**}
H组	449.54	47.60 \pm 5.94 ^{**}	19.60 \pm 2.79 ^{**}

注:与A组比较,[#] $P < 0.01$;与B组比较,^{**} $P < 0.01$ 。表9同。

Note: Compared with those in the group A, [#] $P < 0.01$; Compared with those in the group B, ^{**} $P < 0.01$ (for Tab. 8 - 9).

用生理盐水清洗、滤纸吸干水分,剪取一部分右肺置4%多聚甲醛固定液中包埋,采用苏木素-伊红(HE)染

表9 各组小鼠酚红排泄量比较(n=10)

Tab. 9 Comparison of PSP excretion amount in each group (n=10)

组别	剂量 (mg/kg)	酚红排泄量 ($\bar{X} \pm s, \mu\text{g/mL}$)	组别	剂量 (mg/kg)	酚红排泄量 ($\bar{X} \pm s, \mu\text{g/mL}$)
A组	0		E组	6.67	0.95 ± 0.10
B组		0.75 ± 0.012 [#]	F组	228	1.13 ± 0.14 ^{**}
C组	15.1	1.13 ± 0.16 ^{**}	G组	106	0.94 ± 0.06
D组	360	0.95 ± 0.02	H组	449.54	0.90 ± 0.06

色,显微镜下观察小鼠肺部组织及肺泡结构、肺出血情况、肺泡及血管壁的炎性细胞浸润、肺泡壁是否增厚等病理变化。结果,A组小鼠肺组织结构正常,未见病理变化。B组小鼠肺部组织病理变化明显,出现肺泡壁充血、肺泡融合、肺泡腔中出现炎性细胞浸润(以中性粒细胞为主)及少量红细胞。与B组比较,C组小鼠肺部组织状态改善极大,结构接近正常,仅有少量肺泡融合现象,肺泡中可见少量红细胞,D-H组小鼠肺泡融合、炎性

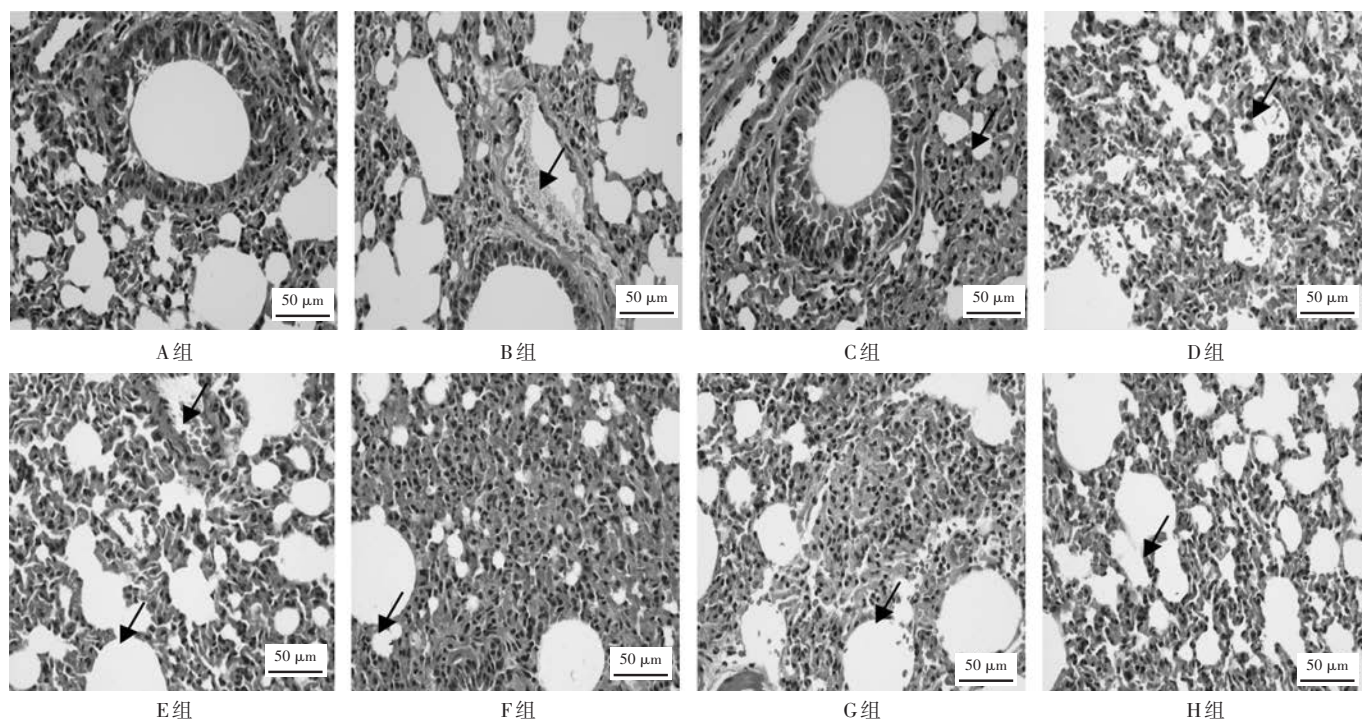


图2 各组小鼠肺组织病理形态比较(HE染色, × 400)

Fig. 2 Comparison of pathological morphology of lung tissue in each group (HE staining, × 400)

细胞浸润程度均减轻,尤其是F组小鼠肺泡结构趋于正常,仅有轻微的肺泡融合现象,且肺泡腔中未见红细胞。详见图2。

3 讨论

本研究中采用多指标响应面法对桔梗叶醇提工艺进行优化,在最优条件下总黄酮提取量为65.3 mg/g。有研究采用酶解-超声耦联法优化桔梗茎叶总黄酮的提取工艺,最优工艺条件下总黄酮得率为6.35%^[19],与本研究结果(6.53%)相当,说明超声法适用于桔梗地上部分总黄酮的提取。谢雄雄等^[20]的研究表明,桔梗60%乙醇提取物可发挥镇咳活性,而本研究中考察的不同萃取部位由桔梗叶44%乙醇提取物制备而来,同样具有显著的镇咳活性,提示采用适当体积分数的乙醇可有效提取桔梗中的镇咳活性物质。此外,张迟^[21]的研究表明,桔梗皂苷类成分是桔梗镇咳的主要物质基础,而本研究结果表明桔梗叶的镇咳活性可能是不同萃取部位中多类别成分协同作用的结果,具体的功效成分有

待后续进一步研究揭示。

桔梗叶醇提物乙酸乙酯萃取部位表现出较其他萃取部位更强的镇咳祛痰活性。有研究表明,该部位含醇类5种,黄酮类、皂苷类、酸类各3种,内酯、烷烃、烯类成分各1种^[6],而贾正等^[22]发现,桔梗根乙酸乙酯部位包括5种醇类、3种皂苷类和1种黄酮类成分,LI等^[23]又发现桔梗根乙酸乙酯部位包括11种木脂素、4种酚类化合物及2种新型化合物(+)-(7R,8R)-palmitoyl alatusol D、(+)-(7R,8R)-linoleyl alatusol D。由此可见,桔梗叶和桔梗根乙酸乙酯萃取部位中均含有皂苷类成分,这可能是桔梗叶镇咳祛痰的活性成分之一。此外,桔梗根乙酸乙酯萃取部位具有区别于叶部的木脂素类成分,而叶部乙酸乙酯萃取部位具有区别于根部的烷烃、烯类、内酯类等成分,这些成分的差异导致生物活性的不同,具体的活性差异还有待进一步研究。目前尚未见桔梗叶镇咳祛痰活性的相关文献报道,同时考虑到桔梗根与叶之间成分的差异性,有必要采用谱效关

联、代谢组学等方法进一步明确桔梗叶镇咳祛痰的活性物质基础。

就作用机制而言,本研究结果初步表明桔梗叶可通过减轻模型小鼠肺部充血、改善人肺部状态,从而发挥镇咳祛痰作用,但具体作用机制有待进一步探讨。单进军等^[24]的研究表明,桔梗汤中有效成分主要通过TLR4、MMP9、IKK2蛋白结合以抑制呼吸道炎症、降低气道黏蛋白水平、降低咳嗽中枢敏感性等方式发挥镇咳祛痰作用,然而桔梗叶的镇咳祛痰作用机制是否与其一致还有待验证。后续可通过研究备受关注的镇咳祛痰通路^[25-27](如TRPA1、TRPV1信号通路、MUC5ac蛋白表达)、炎症通路指标^[28]白细胞介素1 β 等揭示桔梗叶的镇咳祛痰作用机制及其与根部的异同。

综上所述,经超声功率500 W,乙醇体积分数44%,液料比23:1,提取时间43 min,提取温度56℃,提取2次而得的桔梗叶醇提取物,其乙酸乙酯萃取部位较其他萃取部位具有更明显的镇咳祛痰活性。但其具体的成分组成尚待进一步研究。本研究为桔梗叶的深入开发与精准利用提供了理论依据,为将其作为镇咳祛痰功能食品原料提供了依据。

参考文献

- [1] 张岩,魏建和,金钺,等. 桔梗三大主产区栽培技术调查[J]. 中国现代中药,2020,22(5):720-728.
- [2] 陈丹丹,洪挺,王栋,等. 桔梗的化学成分及其药理作用研究概况[J]. 药品评价,2020,17(15):9-11.
- [3] 赵志新,王通,潘苗. 商洛桔梗茎叶中桔梗皂苷D动态研究[J]. 湖北农业科学,2019,58(17):116-118.
- [4] 师绘敏,刘彦楠. 桔梗叶多糖的提取工艺[J]. 天津农业科学,2016,22(7):37-40.
- [5] LEE JW, JI SH, KIM GS, et al. Global profiling of various metabolites in *Platycodon grandiflorum* by UPLC-QTOF/MS[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2015, 16(11): 26786-26796.
- [6] 王翠竹. 桔梗不同部位化学成分及抗抑郁作用的研究[D]. 长春:吉林大学,2018.
- [7] MAZOL L, GLENSKI M, CISOWSKI W, et al. Polyphenolic compounds from *Platycodon grandiflorum* A. DC [J]. Acta Polonica Pharmaceutica, 2004, 61(3): 203-208.
- [8] 张玲,郭宣宣,朱丽丽. 桔梗中苦味物质的分布与动态积累研究[J]. 中药新药与临床药理,2019,30(5):586-591.
- [9] 蔡萧君,顿彦鹏,胡杨,等. 基于UPLC-QTOF-MS技术的桔梗叶提取物对小鼠抑郁作用的尿液代谢组研究[J]. 天津中医药,2020,37(1):109-115.
- [10] LIU D, TAN W. Nutritional composition and antioxidant activities of *Platycodon grandiflorum* flower and leaf[J]. Agro Food Industry Hi-Tech, 2016, 27(4): 44-46.
- [11] 田雨弘. 桔梗的化学成分分析及药理活性研究[D]. 长春:吉林农业大学,2017.
- [12] LI L, XIN Y, YE Z, et al. The Anti-inflammatory Effects and Mechanism of the Stems and Leaves of *Platycodon grandiflorum*[J]. Medicinal Plant, 2015, 6(Z3): 37-39.
- [13] 王新红,张迟,周丽,等. 基于代谢组学的桔梗总皂苷镇咳祛痰作用机制研究[J]. 药学报,2022,57(3):757-765.
- [14] 王巍巍. 桔梗茎叶中皂苷类化学成分及生物活性研究[D]. 长春:吉林农业大学,2008.
- [15] 杨壮,田景奎,张琳,等. 比色法测定桔梗中桔梗总皂苷的含量[J]. 中国现代应用药学,2008,25(1):58-61.
- [16] 张家音,李浩楠,雷嗣超,等. 板栗壳黄酮提取工艺优化及其组成分析[J]. 食品研究与开发,2022,43(6):50-59.
- [17] 梁婷,黄露,曹征宇,等. 清宣止咳颗粒止咳、祛痰、抗炎作用评价[J]. 中成药,2022,44(2):410-415.
- [18] 巫晓慧,王君明,宋玲玲,等. 炮制增强黄药子抗炎镇痛祛痰药效的实验研究[J]. 时珍国医国药,2020,31(11): 2649-2652.
- [19] 许一平,王新功,梁伟玲,等. 酶解-超声偶联法提取桔梗茎叶总黄酮的工艺研究[J]. 化工管理,2020(29):19-20.
- [20] 谢雄雄,张迟,曾金祥,等. 桔梗提取物部位群镇咳祛痰活性与桔梗皂苷成分研究[J]. 中国新药杂志,2019,28(13): 1647-1653.
- [21] 张迟. 基于谱效关系与肠道菌转化及代谢组学的桔梗总皂苷镇咳祛痰药效物质及作用机制研究[D]. 南昌:江西中医药大学,2021.
- [22] 贾正,戚进,朱丹妮,等. 桔梗乙酸乙酯部位的化学成分研究[J]. 药学与临床研究,2009,17(3):202-203.
- [23] LI W, YANG HJ. Phenolic Constituents from *Platycodon grandiflorum* Root and Their Anti-inflammatory Activity[J]. Molecules, 2021, 26(15): 4530.
- [24] 单进军,杨瑞,张新庄,等. 桔梗汤止咳祛痰的网络药理学研究[J]. 中草药,2018,49(15):3501-3508.
- [25] ZHANG L, SUN T, LIU L, et al. The research of the possible mechanism and the treatment for capsaicin-induced cough[J]. Pulmonary Pharmacology & Therapeutics, 2018, 49: 1-9.
- [26] ROMANOVA J, RYDLOVSKAYA A, MOCHALOV S, et al. The Effect of Anti-Chemokine Oral Drug XC8 on Cough Triggered by The Agonists of TRPA1 But Not TRPV1 Channels in Guinea Pigs[J]. Pulmonary Therapy, 2022, 8(1): 105-122.
- [27] ZHANG HH, YU WY, JI LT, et al. Guifu Dihuang Pills Ameliorated Mucus Hypersecretion by Suppressing Muc5ac Expression and Inactivating the ERK-SP1 Pathway in Lipopolysaccharide/Cigarette Smoke Induced Mice [J]. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2021, 2021: 9539218.
- [28] 贺立立,陈勤,彭申明,等. 桔梗皂苷对慢性支气管炎小鼠肺细胞中的IL-1 β 和TNF- α 表达的影响[J]. 中国细胞生物学学报,2013,35(1):17-23.

(收稿日期:2022-11-22;修回日期:2023-02-18)