

- 2018, 223: 33-40.
- [8] Cheng J J, Ma T Y, Liu W, et al. In *in vivo* evaluation of the anti-inflammatory and analgesic activities of compound Muniziqi granule in experimental animal models [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2016, 16: 20.
- [8] 韦 悅, 程娟娟, 程雪梅, 等. 维吾尔药复方木尼孜其颗粒剂的质量控制方法研究[J]. 药物分析杂志, 2017, 37(10): 1799-1809.
- [9] 环敦涵, 李曼琳, 邢建国, 等. 基于色谱-质谱联用技术的复方木尼孜其颗粒化学成分分析与鉴定[J]. 中成药, 2021, 43(5): 1366-1375.
- [10] 林启焰, 谢 凡, 程雪梅, 等. 正交试验优化滋肾养阴颗粒剂提取工艺[J]. 中成药, 2017, 39(1): 213-215.
- [11] 廖成松, 韩阳阳. 瘤果黑种草化学成分及药理作用研究进展[J]. 中成药, 2020, 42(6): 1564-1570.
- [12] 方诗琦, 冷 康, 段金廒, 等. 甘草药渣中黄酮类成分及其抗氧化活性的研究[J]. 中成药, 2015, 37(11): 2443-2448.
- [13] 宗春燕, 苏学军. 三氯化铝比色法测定稻壳中总黄酮含量的方法研究[J]. 化学工程师, 2017, 31(10): 66-69.
- [14] 李国峰, 陈海芳, 郎一帆, 等. 诃子总黄酮提取工艺的优化及其体外生物活性研究[J]. 中成药, 2021, 43(11): 2945-2951.
- [15] 司云珊, 翟宏业, 王 玉, 等. 正交试验法优选散痛风凝胶膏贴剂中总黄酮类成分提取工艺[J]. 中国处方药, 2020, 18(12): 29-30.
- [16] 袁旭江, 张 平, 吴燕红, 等. 毛鸡骨草中总黄酮含量测定方法[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(11): 80-84.
- [17] 邢伯颖, 陈新梅, 秦 乐, 等. 两种显色法测定昆仑雪菊总黄酮含量的比较研究[J]. 化工时刊, 2016, 30(12): 23-25.

白屈菜甘草汁炙工艺的优化

王仁广, 胡力铭, 刘俊泽, 李小欢, 徐丽娅, 王淑敏*
(长春中医药大学药学院, 吉林 长春 130117)

摘要: 目的 优化白屈菜甘草汁炙工艺。方法 在单因素试验基础上, 以炒制温度、炒制时间、甘草与白屈菜比例、甘草汁与白屈菜比例为影响因素, 小檗碱、白屈菜红碱、盐酸黄连碱、白屈菜碱、血根碱总含量为评价指标, Box-Behnken响应面法优化炮制工艺。结果 最佳条件为炒制温度 122 ℃, 炒制时间 9.50 min, 甘草与白屈菜比例 5.2:100, 甘草汁与白屈菜比例 48:100, 5 种生物碱总含量为 11.61 mg/g。结论 该方法合理可行, 操作简便, 可用于规范白屈菜甘草汁炙品的生产工艺及质量控制。

关键词: 白屈菜; 甘草汁炙工艺; Box-Behnken 响应面法

中图分类号: R283

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2023)03-0910-05

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2023.03.037

白屈菜为罂粟科植物白屈菜 *Chelidonium majus* L. 的干燥全草, 具有解痉镇痛、止咳平喘之功效^[1], 常用于治疗慢性支气管炎、哮喘、痉挛等疾病, 其主要成分为生物碱类, 有抗菌、抗炎、抗肿瘤、抑制平滑肌等活性^[2-7], 但该药材具有一定的肝毒性和肺毒性^[8-9], 故需加以炮制以达到增效减毒的目的。目前, 临幊上白屈菜仅经过简单净制后直接使用, 并无特殊炮制方法; 丁原全等^[10]采用醋炙法炮制白屈菜, 以期增强其生物碱的水溶性及止痛作用。

甘草汁作为炮制辅料, 常用来消减中药毒性^[11-12], 其本身具有祛痰止咳、清热解毒的功效^[13-14], 炮制白屈菜时

可缓和药性、降低毒性, 并增强止咳平喘作用。本实验优化白屈菜甘草汁炙工艺, 以期为其规范化及炮制品质量控制提供依据。

1 材料

1.1 仪器 LC-2030 高效液相色谱仪 (日本岛津公司); AB204A/S 型 (万分之一)、ABB5-S 型 (十万分之一) 电子分析天平 (瑞士 Mettler-Toledo 公司)。

1.2 试剂与药物 白屈菜碱 (批号 DST190911-079)、盐酸黄连碱 (批号 DST190913-003)、小檗碱 (批号 DST180603-009)、白屈菜红碱 (批号 34316-15-9)、血根碱

收稿日期: 2021-08-27

基金项目: 吉林省科技发展计划项目 (192485YY010358427)

作者简介: 王仁广 (1993—), 男, 博士生, 从事中药炮制关键技术及科学内涵研究。Tel: 15843053098, E-mail: 727736000@qq.com

*通信作者: 王淑敏 (1965—), 女, 教授, 博士生导师, 从事中药炮制关键技术及科学内涵研究。Tel: 13943028030, Email: 446097156@qq.com

网络出版日期: 2022-08-01

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1368.R.20220729.1814.002.html>

(批号 191115-002) 对照品均购自成都德思特生物技术有限公司, 纯度均 $\geq 98\%$ 。

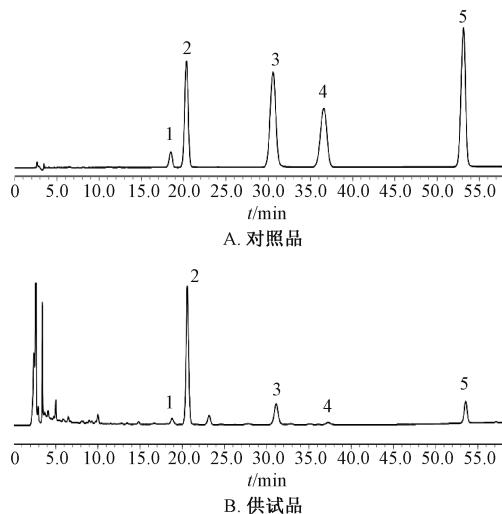
1.3 药材 白屈菜购自河北嘉恒冷背药业有限公司, 批号 HE20170048, 经长春中医药大学药学院姜大成教授鉴定为正品。

2 方法与结果

2.1 甘草汁炙品制备 参考文献 [15] 报道, 称取净甘草片适量, 加10倍量水煎煮3次, 每次1 h, 合并滤液, 浓缩至一定体积, 根据炮制过程中甘草用量稀释成不同浓度。取白屈菜饮片50.0 g, 加入甘草汁搅拌均匀并闷润一段时间, 待药汁全部吸尽后置于炒药机中炒干, 取出, 放凉, 即得。

2.2 含量测定

2.2.1 色谱条件 Waters T₃-C₁₈色谱柱 (250 mm \times 4.6 mm, 5 μm); 流动相乙腈 (A) -1% 三乙胺 (磷酸调节pH至3.0) (B), 梯度洗脱 (0~5 min, 19% A; 5~15 min, 19%~20% A; 15~40 min, 20% A; 40~60 min, 20%~30% A); 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 35 °C; 检测波长 274 nm; 进样量 2.5 μL 。色谱图见图1。



1. 白屈菜碱 2. 盐酸黄连碱 3. 血根碱 4. 小檗碱 5. 白屈菜红碱

图1 各生物碱HPLC色谱图

2.2.2 对照品溶液制备 取白屈菜碱、盐酸黄连碱、血根碱、小檗碱、白屈菜红碱对照品适量, 甲醇稀释, 即得 (各生物碱质量浓度分别为 0.100 2、2.327 6、0.401 2、0.100 2、0.201 0 mg/mL)。

2.2.3 供试品溶液制备 精密称取甘草汁炙品粉末 1.0 g, 置于烧瓶中, 精密加入 20 mL 甲醇, 称定质量后加热回流 1 h, 放冷, 甲醇补足减失的质量, 滤过, 即得。

2.2.4 线性关系考察 精密吸取“2.2.2”项下对照品溶液 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mL, 置于 10 mL 量瓶中, 甲醇定容, 在“2.2.1”项色谱条件下进样测定。以对照品质量浓度为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y) 进行回归, 结果见表1, 可知各生物碱在各自浓度范围内线

性关系良好。

表1 各生物碱线性关系

成分	回归方程	r	线性范围/(mg \cdot mL $^{-1}$)
白屈菜碱	$Y=4786.6X+238.63$ 0.999 8	0.050 0~0.300 6	
盐酸黄连碱	$Y=7924X+490.73$ 0.999 7	0.116 4~0.698 3	
血根碱	$Y=2971.4X-25.50$ 0.999 8	0.020 1~0.120 4	
小檗碱	$Y=4374.3X+310.97$ 0.999 6	0.005 0~0.030 0	
白屈菜红碱	$Y=2230.4X+146.93$ 0.999 8	0.010 1~0.060 3	

2.2.5 精密度试验 取“2.2.2”项下对照品溶液适量, 甲醇稀释 5 倍, 精密吸取 2.5 μL , 在“2.2.1”项色谱条件下进样测定 6 次, 测得白屈菜碱、盐酸黄连碱、血根碱、小檗碱、白屈菜红碱峰面积 RSD 分别为 0.73%、1.15%、0.93%、0.86%、0.64%, 表明仪器精密度良好。

2.2.6 稳定性试验 取同一份供试品溶液, 于 0、3、6、12、24 h 在“2.2.1”项色谱条件下进样测定, 测得白屈菜碱、盐酸黄连碱、血根碱、小檗碱、白屈菜红碱峰面积 RSD 分别为 1.55%、0.32%、0.41%、1.33%、0.83%, 表明溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.2.7 重复性试验 精密称取 6 份甘草汁炙品粉末, 按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液, 在“2.2.1”项色谱条件下进样测定, 测得白屈菜碱、盐酸黄连碱、血根碱、小檗碱、白屈菜红碱峰面积 RSD 分别为 1.22%、1.15%、0.93%、1.64%、1.57%, 表明该方法重复性良好。

2.2.8 加样回收率试验 精密称取各生物碱含量已知的甘草汁炙品粉末 1.0 g, 共 6 份, 精密加入等量对照品溶液 (加入量与粉末中相应成分含量的比例约为 1:1), 按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液, 在“2.2.1”项色谱条件下进样测定, 计算回收率。结果, 白屈菜碱、盐酸黄连碱、血根碱、小檗碱、白屈菜红碱平均加样回收率分别为 99.24%、100.68%、100.38%、98.88%、100.35%, RSD 分别为 1.27%、1.77%、1.89%、1.10%、1.70%。

2.3 单因素试验

2.3.1 闷润时间 精密称取 50.0 g 白屈菜饮片, 平行 2 份, 固定炒制温度 110 °C, 炒制时间 10 min, 甘草与白屈菜比例 6:100, 甘草汁与白屈菜比例 50:100, 设定闷润时间为 10、20、30、40、50、60 min, 结果见图 2。由此可知, 5 种生物碱总含量分别为 10.05、10.98、10.96、10.93、10.95、10.99 mg/g, 即闷润 20 min 时最高, 并且之后保持稳定。因此, 选择闷润时间为 20 min。

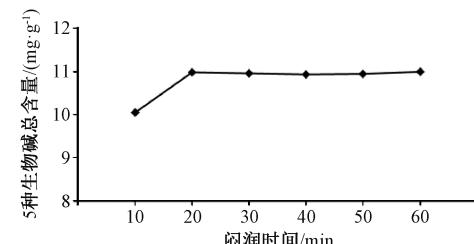


图2 闷润时间对5种生物碱总含量的影响

2.3.2 炒制温度 精密称取 50.0 g 白屈菜饮片, 平行 2

份, 固定闷润时间 20 min, 炒制时间 10 min, 甘草与白屈菜比例 6:100, 甘草汁与白屈菜比例 50:100, 设定炒制温度为 100、110、120、130、140、150 °C, 结果见图 3。由此可知, 5 种生物碱总含量分别为 10.64、11.06、11.51、10.99、10.63、10.48 mg/g, 即在 120 °C 下最高。因此, 选择炒制温度为 120 °C。

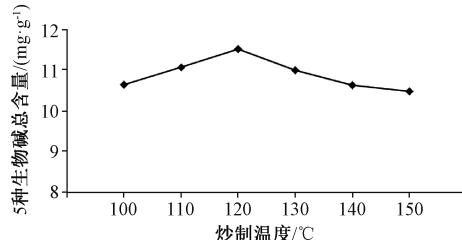


图 3 炒制温度对 5 种生物碱总含量的影响

2.3.3 炒制时间 精密称取 50.0 g 白屈菜饮片, 平行 2 份, 固定闷润时间 20 min, 炒制温度 120 °C, 甘草与白屈菜比例 6:100, 甘草汁与白屈菜比例 50:100, 设定炒制时间为 8、9、10、11、12、13 min, 结果见图 4。由此可知, 5 种生物碱总含量分别为 10.66、11.04、11.47、11.01、10.62、10.33 mg/g, 即炒制 10 min 时, 5 种生物碱总含量最高。因此, 选择炒制时间为 10 min。

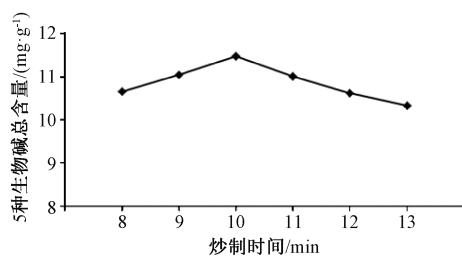


图 4 炒制时间对 5 种生物碱总含量的影响

2.3.4 甘草与白屈菜比例 精密称取 50.0 g 白屈菜饮片, 平行 2 份, 固定闷润时间 20 min, 炒制温度 120 °C, 炒制时间 10 min, 甘草汁与白屈菜比例 50:100, 设定甘草与白屈菜比例为 3:100、4:100、5:100、6:100、7:100、8:100, 结果见图 5。由此可知, 5 种生物碱总含量分别为 10.67、11.03、11.42、11.06、10.79、10.54, 即两者比例为 5:100 时最高。因此, 选择甘草与白屈菜比例为 5:100。

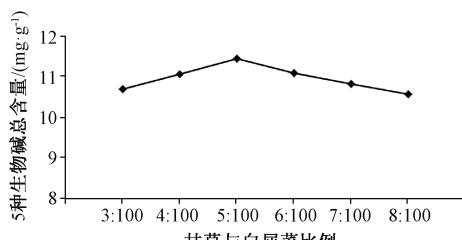


图 5 甘草与白屈菜比例对 5 种生物碱总含量的影响

2.3.5 甘草汁与白屈菜比例 精密称取 50.0 g 白屈菜饮片, 平行 2 份, 固定闷润时间 20 min, 炒制温度 120 °C, 炒制时间 10 min, 甘草与白屈菜比例 5:100, 设定甘草汁与白屈菜比例 20:100、30:100、40:100、50:100、60:100、70:100、80:100, 结果见图 6。由此可知, 5 种生物碱总含量分别为 10.44、10.81、11.13、11.51、10.99、10.56、10.26 mg/g, 即两者比例为 50:100 时最高。因此, 选择甘草汁与白屈菜比例为 50:100。

与白屈菜比例为 20:100、30:100、40:100、50:100、60:100、70:100、80:100, 结果见图 6。由此可知, 5 种生物碱总含量分别为 10.44、10.81、11.13、11.51、10.99、10.56、10.26 mg/g, 即两者比例为 50:100 时最高。因此, 选择甘草汁与白屈菜比例为 50:100。

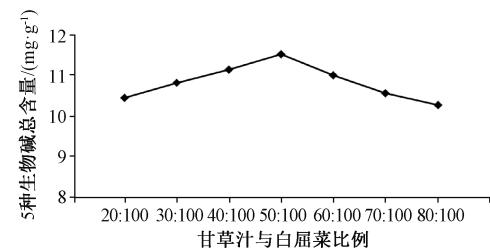


图 6 甘草汁与白屈菜比例对 5 种生物碱总含量的影响

2.4 Box-Behnken 响应面法 在单因素试验基础上, 选择炒制温度 (A)、炒制时间 (B)、甘草与白屈菜比例 (C)、甘草汁与白屈菜比例 (D) 作为影响因素, 5 种生物碱总含量 (Y) 作为评价指标, 设计四因素三水平 (-1、0、1) 响应面试验, 因素水平见表 2, 结果见表 3。

表 2 因素水平

因素	水平		
	-1	0	1
A 炒制温度/°C	110	120	130
B 炒制时间/min	9	10	11
C 甘草与白屈菜比例	4:100	5:100	6:100
D 甘草汁与白屈菜比例	40:100	50:100	60:100

表 3 试验设计与结果

试验号	A	B	C	D	Y 5 种生物碱总含量/(mg·g⁻¹)
1	0	1	-1	0	10.57
2	0	0	0	0	11.44
3	0	0	0	0	11.52
4	-1	0	-1	0	10.59
5	0	0	-1	-1	10.46
6	0	-1	1	0	10.93
7	-1	0	1	0	10.47
8	0	1	0	-1	10.58
9	0	0	-1	1	11.12
10	0	0	1	-1	10.45
11	0	1	1	0	10.43
12	0	-1	0	-1	10.94
13	0	-1	0	1	11.10
14	0	0	0	0	11.58
15	-1	-1	0	0	10.91
16	1	0	-1	0	11.00
17	1	0	1	0	10.40
18	0	0	0	0	11.56
19	0	0	1	1	10.41
20	0	-1	-1	0	11.11
21	0	1	0	1	10.39
22	-1	0	0	1	10.52
23	0	0	0	0	11.55
24	1	-1	0	0	11.15
25	1	0	0	1	10.76
26	-1	0	0	-1	10.36
27	1	0	0	-1	10.60
28	1	1	0	0	10.42
29	-1	1	0	0	10.41

采用 Design-Expert 12.0 软件对表 2 数据进行多元回归分析, 得方程为 $Y = 11.53 + 0.089A - 0.28B - 0.15C + 0.075D - 0.057AB + 0.12AC - 1.112 \times 10^{-3}AD + 0.010BC - 0.086BD - 0.18CD - 0.49A^2 - 0.32B^2 - 0.44C^2 - 0.48D^2$, 方差分析见表 4。由此可知, 模型 $P < 0.01$, 具有高度显著性; 失拟项 $P > 0.05$, 表明模型可靠; 相关系数 $R^2 = 0.9787$, 表明模型能解释 97.87% 响应值的变化; 因素 A 、 B 、 C 、 D 、 A^2 、 B^2 、 C^2 、 D^2 、 AC 、 CD 有显著影响 ($P < 0.05$); 各因素影响程度依次为 $B > C > A > D$ 。

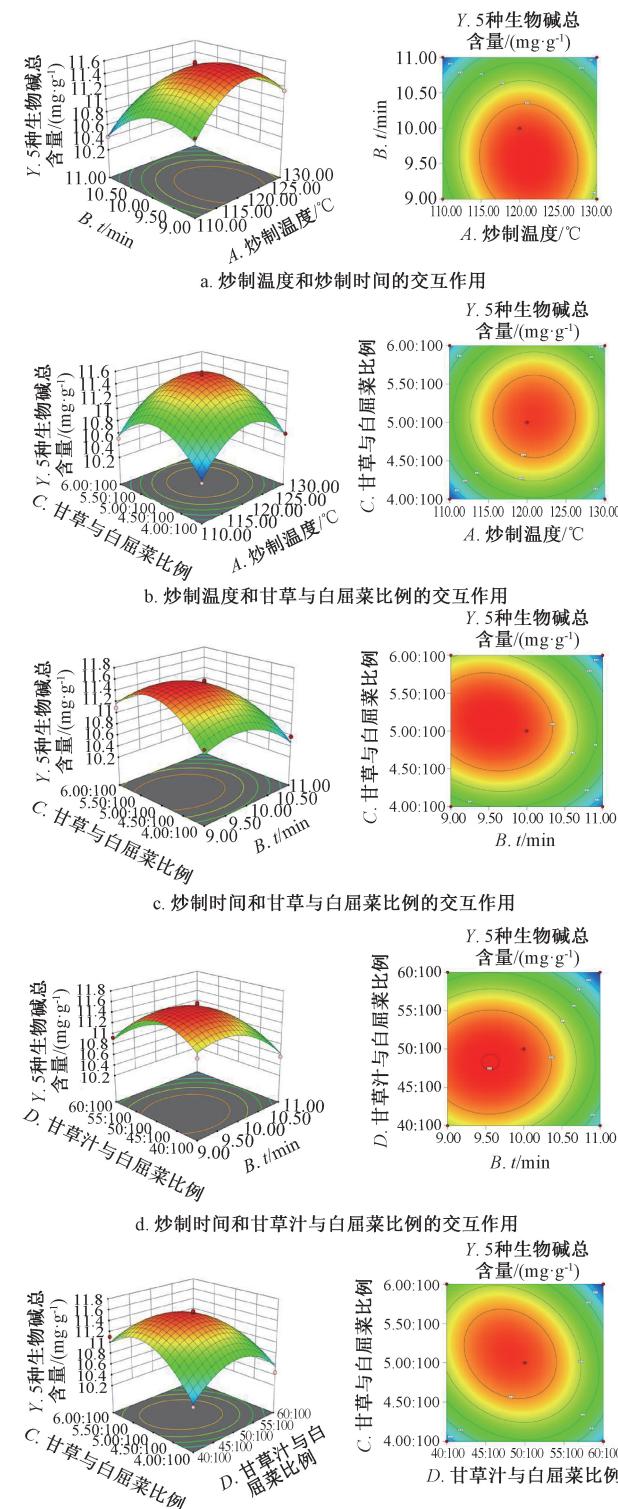
表 4 方差分析

来源	离均差平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	4.79	14	0.34	46.00	<0.0001
A	0.094	1	0.094	12.67	0.0031
B	0.93	1	0.93	124.49	<0.0001
C	0.26	1	0.26	34.38	<0.0001
D	0.068	1	0.068	9.11	0.0092
AB	0.013	1	0.013	1.74	0.2089
AC	0.058	1	0.058	7.78	0.0145
AD	4.95×10^{-6}	1	4.95×10^{-6}	6.66×10^{-4}	0.9798
BC	4.05×10^{-4}	1	4.05×10^{-4}	0.054	0.8189
BD	0.03	1	0.029	4.02	0.0648
CD	0.12	1	0.12	16.67	0.0011
A^2	1.55	1	1.55	207.71	<0.0001
B^2	0.65	1	0.65	87.54	<0.0001
C^2	1.28	1	1.28	171.61	<0.0001
D^2	1.47	1	1.47	197.15	0.0001
残差	0.1	14	7.439×10^{-3}	—	—
失拟项	0.092	10	9.230×10^{-3}	3.12	0.1423
纯误差	0.012	4	2.961×10^{-3}	—	—
误差和	4.90	28	—	—	—

通过 Design-Expert 12.0 软件进行响应面分析, 结果见图 7, 可知炒制温度和甘草与白屈菜比例、甘草与白屈菜比例和甘草汁与白屈菜比例交互作用较为显著, 而其他因素交互作用不显著。最终确定, 最优工艺为炒制温度 121.46 °C, 炒制时间 9.52 min, 甘草与白屈菜比例 5.16 : 100, 甘草汁与白屈菜比例 47.78 : 100, 5 种生物碱总含量为 11.63 mg/g, 考虑到实际操作可行性, 将其修正为炒制温度 122 °C, 炒制时间 9.50 min, 甘草与白屈菜比例 5.2 : 100, 甘草汁与白屈菜比例 48 : 100。

2.5 验证试验 取白屈菜饮片 3 份, 按“2.4”项下优化工艺进行验证试验。结果, 5 种生物碱总含量分别为 11.60、11.62、11.59 mg/g, 平均值为 11.61 mg/g, 与预测值 11.63 mg/g 接近 (RSD 为 0.14%), 表明该工艺合理可行。

2.6 不同炮制品比较 称取白屈菜饮片 50.0 g, 置于炒药机中, 在 122 °C 下炒制 9.50 min, 取出, 放凉, 即得清炒品; 参考文献 [13] 报道, 加入米醋 10 g 拌匀, 用文火加热炒干, 即得醋炙品。取生品、甘草汁炙品、醋炙品、清炒品粉末适量, 按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液, 在“2.2.1”项色谱条件下进样测定。结果, 5 种生物碱总



注: 左图为三维曲面图, 右图为等高线图。

图 7 各因素响应面图

含量分别为 11.71、11.61、11.57、10.08 mg/g。

3 讨论

参考文献 [16] 报道, 在含量测定中本研究选择乙腈和 1% 三乙胺溶液作为流动相, 并且对流动相的比例进行考察, 结果在等度洗脱条件下不同比例流动相均无法使 5 种

待测成分色谱峰与相邻色谱峰达到有效分离,因此选择梯度洗脱对甘草汁炙品样品中的5种生物碱成分进行分离,此时各成分色谱峰峰形良好,基线分离,分离度大于1.5。白屈菜中有多种生物碱成分,以单一生物碱作为指标不足以说明和控制甘草汁炙品的质量。因此,本研究选择具有代表性的白屈菜碱等5种生物碱作为指标性成分。

与生品相比,白屈菜甘草汁炙品5种生物碱总含量略有下降,说明在炮制过程中由于操作不当会损失一些成分,而甘草汁炙品5种生物碱总含量略高于醋炙品,甘草汁炙品、醋炙品中5种生物碱总含量都明显高于清炒品,说明甘草汁炙和醋炙均可增强白屈菜中生物碱成分的稳定性。课题组后期将通过药理学、基因组学、分析化学等角度比较白屈菜甘草汁炙前后止咳平喘等作用的差异、毒性的变化,并且明确其增效减毒的物质基础,为相关临床治疗及开发利用奠定基础。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2020年版一部 [S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 112-113.
- [2] Strzemski M, Dresler S, Podkościelna B, et al. Effectiveness of volatile natural deep eutectic solvents (VNADESs) for the green extraction of *Chelidonium majus* isoquinoline alkaloids [J]. *Molecules*, 2022, 27(9): 2815.
- [3] Krizhanovska V, Sile I, Kronberga A, et al. The cultivation of *Chelidonium majus* L. increased the total alkaloid content and cytotoxic activity compared with those of wild-grown plants [J]. *Plants (Basel)*, 2021, 10(9): 1971.
- [4] Maggini V, Lombardi N, Crescioli G, et al. *Chelidonium majus*: relevant safety aspects of a hepatotoxic plant, trawling the web [J]. *Phytother Res*, 2019, 33(9): 2465-2469.
- [5] Pan J L, Yang Y, Zhang R, et al. Enrichment of chelidonine from *Chelidonium majus* L. using macroporous resin and its antifungal activity [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2017, 1070: 7-14.
- [6] Shen L, Lee S, Joo J C, et al. *Chelidonium majus* induces apoptosis of human ovarian cancer cells via ATF3-mediated regulation of Foxo3a by Tip60 [J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2022, 32(4): 493-503.
- [7] Zielińska S, Jezierska-Domaradzka A, Wojciak-Kosior M, et al. Greater celandine's ups and downs-21centuries of medicinal uses of *Chelidonium majus* from the viewpoint of today's pharmacology [J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 299.
- [8] Wu C T, Wang X, Xu M, et al. Intracellular accumulation as an indicator of cytotoxicity to screen hepatotoxic components of *Chelidonium majus* L. by LC-MS/MS [J]. *Molecules*, 2019, 24(13): 2410.
- [9] 刘建明, 刘宸辰, 刘新民, 等. 白屈菜赤碱对大鼠肺组织的长期毒性作用及其对肺组织中NF-κB表达的影响 [J]. 吉林大学学报(医学版), 2019, 45(3): 518-523.
- [10] 丁原全, 李瑞海, 贾天柱. 白屈菜炮制方法的初步研究 [J]. 化学工程师, 2020, 34(2): 68; 73-75.
- [11] 赵芳菲, 程再兴, 蔡真真, 等. 不同比例甘草炮制对吴茱萸水提物指纹图谱和肝毒性的影响 [J]. 福建中医药, 2020, 51(1): 69-72; 68.
- [12] 赵小梅, 宫 娆, 董捷鸣, 等. 甘草炮制雷公藤降低其肝毒性作用的初步研究 [J]. 中国中药杂志, 2017, 42(1): 119-124.
- [13] 李 冀, 李 想, 曹明明, 等. 甘草药理作用及药对配伍比例研究进展 [J]. 上海中医药杂志, 2019, 53(7): 83-87.
- [14] 李鹏杰, 邓 毅, 曼 琼, 等. 甘草解毒现代研究进展 [J]. 中国中医药信息杂志, 2019, 26(3): 137-140.
- [15] 历淑芬, 鲍雯雯, 杜伟锋, 等. 基于中试水平的炮制辅料甘草汁制备工艺研究 [J]. 中药材, 2011, 34(10): 1514-1517.
- [16] 赵胜男, 李瑞海, 贾天柱. 21个批次白屈菜6种成分含量测定研究 [J]. 中华中医药学刊, 2020, 38(11): 207-209.