

款冬花活性成分的分离纯化和质量控制研究进展

曹 坤¹, 徐 溢^{1*}, 王昌瑞¹, 赵天明²

¹重庆大学化学化工学院, 重庆 400030; ²法国国立图卢兹理工学院, 图卢兹 31000

摘要: 款冬花是传统中药植物, 含有萜类、黄酮、生物碱等多种化学成分, 具有祛痰、止咳、平喘等作用。本文在简述款冬花的化学成分和药理作用的基础之上, 重点总结了款冬花活性成分的分离纯化方法、分析测试方法和质量控制标准, 以期为款冬花的深入研究和开发利用奠定基础。

关键词: 款冬花; 分离; 纯化; 质量控制

中图分类号: R284; R931

文献标识码: A

Developments of Separation, Purification and Quality Control for the Chemical Constitutions of *Tussilago farfara*

CAO Kun¹, XU Yi^{1*}, WANG Chang-rui¹, ZHAO Tian-ming²

¹Chemistry and Chemical Engineering, Chongqing University, Chongqing 400030, China;

²National Polytechnic Institute of Toulouse, Toulouse 31000, France

Abstract: The flower buds of *Tussilago farfara* was called as “Kuan Donghua” in China. It contained terpenoids, flavonoids, alkaloids and other phytochemicals, also known well as traditional Chinese medicine to treat expectorant, cough, asthma and so on. Based on the brief introduction of the phytochemical profiles and pharmacological effects of flower buds of *Tussilago farfara*, the latest research and developments was focused on in this paper, especially the separation and purification methods of active chemical components, analytical test methods and quality control standards for flower buds of *Tussilago farfara*. The information would provide the foundation of further research, development and utilization of the flower buds of *Tussilago farfara*.

Key words: *Tussilago farfara*. ; separation; purification; quality control

款冬花为双子叶植物药, 菊科款冬属植物——款冬(*Tussilago farfara* L.) 的干燥花蕾。又名冬花、款花、九九花等。主要分布在河北、河南、湖北、四川等地。款冬花性辛、温, 为一种常用中药, 在历版《中华人民共和国药典》中均有记载, 具有润肺下气, 化痰止咳的功效^[1]。目前, 国内外对款冬花的研究相对较少, 已有的研究主要集中在化学成分、药理作用, 对在款冬花的分离纯化方法、药材质量控制方面很少涉及。本文在简述其化学成分及其药理作用的基础上, 对其主要活性组分分离纯化方法进行了归纳总结, 并对其质量控制方面的研究进展进行分析和综述, 为款冬花的综合利用提供依据。

1 款冬花的化学成分及其药理作用

1.1 主要化学成分

自上世纪 70 年代, 国内外学者开始对款冬花的化学成分进行了系统深入的研究。目前报道的款冬花的化学成分主要有黄酮类、萜类、生物碱、挥发油和其他类化学成分。

已分离得到的黄酮类化合物主要有芦丁(rutin)、金丝桃苷(hyperin)、山奈酚(kaempferol)、槲皮素(quercetin)、槲皮素-3-阿拉伯糖苷(quercetin-3-arabinoside)^[2]、山奈素-3-芸香糖苷(kaempferol-3-rutinoside)、橙皮苷(hesperidin)、槲皮苷(quercitrin)、异槲皮苷(Isoquercitrin)等。

中药款冬花的相关研究大多集中在萜类, 包括倍半萜类化合物和三萜类化合物。倍半萜类化合物主要包括款冬花酮(Tussilagonone)、新款冬花内酯(Neotussilagolactone)、1a-(2-甲基丁酸)款冬花素酯(14-acetoxy-7β-(3-ethylcis-crotonoyloxy)-1α-(2-meth-

收稿日期: 2013-08-05 接受日期: 2013-11-06

基金项目: 国家科技部“创新药物孵化基地课题”中药活性成分分离纯化平台项目(2010ZX09401-306-1-5); 国家科技部-科技人员服务企业行动项目(2009GJF10037); 重庆市科委科技计划项目攻关项目(CSTC, 2010AC5050)

* 通讯作者 Tel: 86-23-65111022; E-mail: xuyibbd@equ.edu.cn

ylbutyryloxy)-notonipetranone)、款冬花素内酯(tussilagolactone)^[3]、 1α -(3'-ethyl-cisrotonoyloxy)-8-angeloyloxy-3 β ,4 β -epoxybisabola-7(14),10-diene,7 β -angeloyloxy-14-hydroxy-notonipetranone 和 1α -hydroxy-7 β -(4-methylsenecioyloxy)-oplopa-3(14)Z,8(10)-dien-2-one^[4]等。三萜类化合物主要有款冬二醇(faradiol)、金山车二醇(amidiol)、款冬巴尔新二醇(bauer-7-ene-3 β ,16 α -diol)、巴尔三萜醇(bauenol)、异巴尔三萜醇(isobauenol)等。

生物碱类化合物主要含有双稠吡咯里西啶生物碱千里光宁、千里光非宁、senkirkine^[5]、isotussilage^[6]以及单酯类双稠吡咯啉生物碱,即款冬花碱(tussilage)^[7]。

已报道的挥发油成分主要有:1-壬烯(1-nonene),1-癸烯(1-octene),1-十一碳烯(1-undecene),1-十二烯(1-dodecene),1-十三碳烯(1-teidecene),1-十五碳烯(1-pentadecene),甜没药烯(bisabolene),香荆芥酚(carvacrol),棕榈酸甲酯(methyl palmitate)^[8]等。

此外,款冬花中还包含有蒲公英黄色素(Iaraxantin),尿嘧啶核苷(uridine),蔗糖(sucrose),胡萝卜苷(daucosterol), β -谷甾醇(β -sitosterol), γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid),丙氨酸(alanine)。无机元素如锌、铁、铜、锰、钴。

款冬花的药效成分集中在黄酮类、萜类、挥发油类成分,其中,款冬酮、芦丁、槲皮素具有明确的药效,它们均是款冬花的标示性成分或宏量成分。此外,款冬花中多糖成分具有明显药效,生物碱中的克氏千里光碱(senkirkine)具有肝毒性,可引起炎症。它们也逐渐成为款冬花研究的重点。

1.2 药理作用及生物毒性

研究发现,款冬花具有止咳、祛痰和平喘作用^[9,10],抗炎作用^[11-14],抗肿瘤作用^[15],对呼吸系统有兴奋作用,对心血管有升压作用^[16],具有抗血小板活化因子作用^[17],可抑制血小板聚集等药理活性。

款冬花中含有的克氏千里光碱(senkirkine)属于吡咯里西啶类生物碱(Pyrrolizidine alkaloids, PAs),具有迟发型肝毒性,可引起肝脏毒性^[18]。鉴于此,一些国家对款冬花禁止使用,导致款冬花的使用受限。研究发现^[19]对小鼠灌胃给予款冬花水提液、醇提液、总生物碱、非生物碱、克氏千里光碱,只有总生物碱、克氏千里光碱显示出明显的肝脏毒性。这可能是由于款冬花中的千里光碱含量很低,且该

类生物碱不易溶于水,致使水煎液中毒性物质质量远低于制毒剂量。而且多年临床经验,并未发现含有款冬花的复方有不良反应。据此可以推测,复方除了水煎外,配伍中可能存在药物间的相互作用而使其毒副作用降低。因此,加强配伍研究,加强不同提取方法及其工艺的研究,对寻找能降低、减少甚至消除其中克氏千里光碱毒性的方法具有重要意义。

2 款冬花活性组分的提取、分离和纯化

综合提取是植物开发利用的基础,是中药质量控制的重要环节。总结天然植物的研究方法,改进活性组分的提取、分离和纯化方法,从而提高其开发利用价值,为款冬花的质量评价提供科学依据。根据研究对象的不同,款冬花的提取、分离和纯化方法集中于以下活性组分:款冬酮,芦丁等黄酮组分,多糖组分,生物碱及其他组分等。

2.1 款冬酮的提取分离和纯化

款冬酮属于倍半萜类化合物,具有升高血压等药理作用,可作为质量控制的专属性指标成分。在常规溶剂提取法中,对款冬酮提取效率的影响因素较多,研究发现其影响大小依次为:提取方式>提取溶剂>提取体积>提取时间^[20]。超临界CO₂流体萃取法(Supercritical CO₂ fluid extraction, SFE-CO₂)对款冬酮的提取效果优于常规溶剂提取法^[21],具有萃取时间短、萃取效率高、避免有机溶剂残留及对环境污染等优点。新近提出的亚临界水萃取(Subcritical water extraction, SCWE)是采用水为溶剂,在100~374℃、压力足够高时,使水保持在液体状态,通过程序升温 and 压力控制来调节水的极性^[22],实现选择性萃取,具有能耗低、快速、环境友好的优点,是一种非常有前景的分离提取纯化技术。与SFE-CO₂萃取相比这项技术有更广的极性范围,国外已经将该技术应用在天然产物分析过程中^[23],也可应用于款冬酮的快速提取。Wang^[24]使用高速逆流色谱法(High-speed countercurrent chromatography, HSCCC)对款冬花提取物进行分离和纯化,可获得纯度达到99.5%的款冬酮。HSCCC与传统的柱层析法相比,避免了不易控制、繁琐的分离操作,分离时间短,分离纯度和制备量高。

2.2 芦丁等黄酮组分的提取分离和纯化

黄酮类化学成分是款冬花的主要活性成分之一,主要包括芦丁等组分,款冬花的镇咳、祛痰、平喘与其所含的黄酮类成分有关。

以款冬花总黄酮为评价指标,微波提取法和超声提取法提取效果^[25,26]优于乙醇回流法、沸水煎煮法,适用于工业化生产,可避免有效成分的分解。但这些方法均是采用单级提取法,相对多级提取法——连续逆流提取法(continuous countercurrent extraction),存在着提取率较低、溶剂用量大、提取时间长,后续处理量大的问题。由于实现了溶剂与固体物料的逆流接触,浓度梯度大,提取推动力大,扩散边界层薄且更新快,连续逆流提取法的提取率和提取时间都优于单级提取法。王松等^[27]使用该方法从豆粕中提取大豆异黄酮,提取率达99.2%将该法应用在款冬花黄酮类成分提取中,对提高原料利用率,节省成本方面有着重要的现实意义。

在分离纯化方面,应用大孔吸附树脂技术对款冬花乙醇提取物中总黄酮具有较好的纯化效果^[28],其工艺稳定,操作简单,适于工业化生产。如何选择获得针对性好的大孔吸附树脂,是黄酮组分分离关注的重点。Xiao等^[29]应用HSCCC法从黄芪(Radix Astragali)中分离纯化得到5种黄酮苷类化合物,纯度达到了90%以上,该方法克服了传统硅胶柱分离纯化黄酮类化合物时耗时,耗溶剂和制备量小等缺点,显示出其从传统植物药中发现和纯化单体化合物有着极大应用潜力。

2.3 款冬花多糖组分的提取、分离和纯化

款冬花多糖组分具有抗肿瘤、免疫、抗凝血、降血糖和抗病毒等多种活性,在医药领域广泛应用。超声提取法(Ultrasonic extraction, UE)对款冬花多糖成分具有较好的提取效果,较常规溶剂提取方法可缩短提取时间71%,多糖提取率达到19.48%^[30]。

酶法辅助提取技术由于酶反应条件温和,操作简便,成本低廉,能较大幅度提高药物有效成分的提取率,近年来逐渐受到重视,在多糖提取中应用也越来越广。该法应用于黄芪多糖的提取^[31],多糖提取率比传统方法提高了20.2%。因此,将酶解法结合超声提取法应用于款冬花等中药材的多糖分离,既能够有选择地改变提取的目标成分的性质,加强药物的生理活性;又能够去除体系内杂质,提高提取液的澄清度,改善质量。

对于多糖的脱色和纯化,大孔吸附树脂法对款冬花多糖的脱色效果优于双氧水氧化脱色法、活性炭吸附脱色法、反胶束溶液脱色法,脱色率可达94.19%,多糖保留率为73.02%^[32]。膜分离技术作为一种新兴技术,也可应用到款冬花多糖的分离和纯化上,董艳等^[33]采用膜分离技术(Membrane separa-

tion technology, MST)对地黄低分子多糖进行超滤和纳滤提取纯化,蛋白去除率达94.15%,脱色率达82.31%,脱盐率达72.8%,多糖制品收率和纯度分别为46.63%和93.3%。

2.4 生物碱及其他组分的提取、分离和纯化

款冬花中具有肝毒性的吡咯里西啶类生物碱,是关系到用药安全的重要问题,加大对生物碱的研究,对款冬花的深度开发利用具有重要意义。Zhang^[34]研究了加热加压下的微波提取方法(Microwave extraction, ME)对PAs的最佳提取工艺。Ouyang等^[35]首次使用Prep-HSCCC法对雷公藤生物碱进行分离,从中分离得到雷公藤春碱、雷公藤碱、雷公藤次碱、雷公藤晋碱等4种生物碱,纯度达90%以上,实现了高纯度、大制备量、高回收率,显示了HSCCC在分离纯化天然植物中生物碱类成分的巨大优势。

此外,款冬花中的挥发油组分相关研究也已报道^[36,37],主要采用水蒸气蒸馏法(Water steam distillation, WSD)、同时蒸馏萃取法(Simultaneous distillation extraction, SDE)和气相色谱-质谱联用技术(GC/MS)对款冬花挥发油进行研究。综上所述,针对款冬花植物中不同的有效成分,我们需要选择不同的针对性的提取方法,才能有效提高植物的提取效率,降低成本,减少环境污染。

3 款冬花中有效成分检测和质量控制

3.1 多种化学成分分析测试:

中药品质主要与外观形态和内在质量有密切关系,活性组分的定量分析是质量控制最直接、最重要的手段^[38]。已有研究主要是通过紫外-可见分光光度法(UV-Vis)、高效液相色谱法(HPLC)、HPLC与二极管阵列(DAD)和蒸发光散射检测器(ELSD)联用技术、火焰原子发射光谱吸收法(Atomic emission spectroscopy, AES)等方法对款冬花中款冬酮、黄酮、多糖、没食子酸、微量元素等进行分析和测试。

款冬酮是款冬花的特有成分,建立明确的款冬酮测定方法,对款冬花的质量控制有极其重要的意义。张志伟等^[39]采用RP-HPLC法对款冬花中款冬酮含量进行定量测定,以此对款冬花质量进行控制。HPLC-DAD-ELSD联用技术能够有效的解决分析中化学组分没有紫外吸收或紫外末端吸收现象所带来的问题,在中药有效成分检测方面得到广泛应用。Qi等^[40]应用HPLC-DAD-ELSD方法测定了黄芪中黄酮和皂苷类成分的含量,用以的对黄芪药材进行

全面质量评价。该方法精密度高、重复性好和准确性高。HPLC-DAD-ELSD 联用技术还用于山银花药材的质量评价,且已被收入 2010 版《中华人民共和国药典》^[1],这是中国药典首次收载联用技术用于中药质量评价,该方法对款冬酮的快速、准确测定也有重要的参考价值。

UV-Vis 法^[41]是目前用于控制款冬花中黄酮类化合物鉴别和含量的常用和有效方法之一。HPLC 法色谱条件适应性好、分离效能高、选择性高、分离速度快,已成为中药分析和质量评价领域中主流技术,已有研究采用 HPLC 法测定款冬花中芦丁^[42]、异槲皮苷、绿原酸^[43]、槲皮素和山奈酚^[44]的含量,以此作为指标来表征药材质量,这为款冬花药材质量评价提供了依据。此外,HPLC-DAD-ELSD 联用技术^[38]可用于同时定量分析有紫外和无紫外吸收的多类成分群;液相色谱-质谱联用技术(LC-MS)技术^[38]被广泛地应用到中药多类成分的定性鉴别、定量分析和质量评价中。

多糖、没食子酸和微量元素的含量测定。吕培霖等^[45]应用 UV-Vis 法测定不同种类款冬花中多糖的含量,以此比较各类植物的质量;许丽霞等^[46]采用 HPLC 法建立了测定款冬花中没食子酸的含量的方法,并将没食子酸作为控制药材质量的指标成分。款冬花中微量元素的含量主要采用 AES 法检测^[47]。有些课题组^[48]还对款冬花的水分、灰分、酸不容灰分、浸出物、农药残留、重金属等进行了研究。

对不同产地的款冬花的多成分测定,是款冬花良好农业规范(Good agricultural practices, GAP)实施的关键。款冬花中铜、铁、锌、钙、镁 5 种是人体生命活动必须的微量元素,与人体健康、疾病防治有很紧密的关系。款冬花含有的芦丁等黄酮类组分、多糖组分、水分、总灰分、水浸出物、醇浸出物、挥发物含量也是款冬花重要的质量指标。单一评价任何一种成分的价值显得极不充分,应当采用灰色关联度分析方法(Grey Relatinal Analysis)^[49],对不同产地款冬花中的微量元素、多糖、芦丁等成分进行评价研究,构建质量识别模型,用总关联度评价款冬花的质量优劣,才能够全面的对款冬花植物的质量进行控制。

上述这些方法均可用在款冬花的质量控制研究,为药材的质量控制和产业化开发提供参考和依据。

3.2 款冬花及其药品的质量控制

3.2.1 现有质控标准和方法

款冬花药用历史悠久,在临床上应用较为广泛。目前,已有的对款冬花质量标准主要依据药典标准【中华人名共和国药典】,包括:性状鉴别和理化鉴别。理化鉴别主要通过薄层色谱法(TLC)和 HPLC 法对款冬酮含量进行了控制。2005 版《中国药典》只是规定了用款冬花的性状来控制其质量,无法从化学组分的内在因素上鉴定款冬花和控制其质量。2010 版《中国药典》^[1]规定了药材性状鉴别,而理化鉴别仅以款冬酮含量不得少于 0.070% 为指标。浸出物采用热浸法测定,以乙醇做溶剂,不得少于 20.0%。饮片浸出物不得少于 22%。

款冬花作为天然植物,在国外药典中也有记载,被用于治疗呼吸道疾病。美国草药典^[50](American Herbal Pharmacopoeia)中对款冬花的植物性状进行了描述,并介绍了款冬花和伪品蜂斗菜属植物的区别,但是未对款冬花成分进行控制。美国药典、日本药典、欧洲药典均未对款冬花植物进行记载。

由此可见,已有的指标较为简单,难以在款冬花的种植、生产过程和产品阶段对款冬花给出科学的质量评价标准体系,影响了临床用药的安全有效^[48]。因此,如何将我们在前述章节中总结归纳的相关提取分离、纯化和分析检测技术有机结合,在现有基本标准的基础之上,提出合理的多指标多参数质控体系,获取高纯度组分标品,建立针对款冬花中化学组分的高效测试方法和质量控制方法、标准和体系,在现阶段仍有重要的研究价值和实用意义。

3.2.2 款冬花指纹图谱建立和应用

中药指纹图谱是指中药产品经相应处理后,采用一定的分析手段,得到的能够标示产品整体化学特征的色谱图或光谱图,它较为全而地反映中药及其制剂中所含化学成分的种类与数量,进而对药品质量进行整体描述和评价^[51]。利用各种光谱、色谱或联用技术等现代分析技术,研制中药的“指纹图谱”来评价质量一致性和产品稳定性,在一定条件下能够反映中药内含物质群的全貌,使其质量评价由单纯的含量测定上升为中药整体物质的全面控制,符合“多成分”“多途径”、“多靶点”的中药作用特点。中药指纹图谱在评价中药材、制剂半成品过程控制、成品质量的真实性等方面具有较好的优势^[38]。

建立指纹图谱目前研究最多的是 HPLC 法,其简便、准确、重现好,适用于中药材鉴别研究。马致洁等^[39]采用 HPLC 法建立了款冬花药材中黄酮醇

苷类成分指纹图谱,所建立的指纹图谱方法操作性强,可作为款冬花黄酮纯苷类成分指纹图谱研究的基础,用于黄酮醇苷类成分的质量控制。刘玉峰^[52]建立了10批款冬花样品药材的指纹图谱,测定出25个共有色谱峰,该方法建立的指纹图谱特征为科学评价其质量提供可靠方法,显示出了中药材质量控制的强大效力。

应用超高效液相色谱-质谱联用技术(UPLC-MS)、HPLC-DAD-ELSD、高效毛细管电泳技术(CE)^[38]、GC-MS^[38]等方法建立指纹图谱也越来越多,显示了强大的优势。如刘树民等^[53]采用UPLC-MS法对黄芩进行了指纹图谱测定,测定出23个共有峰,该方法大大缩短了分离时间,提高了分离效率和检测灵敏度,实现对共有峰的准确定位,可用于天然植物的鉴别和质量评价。王国艳等^[54]采用HPCE技术建立了款冬花的指纹图谱,确定了26个共有峰,该方法操作简单,为款冬花药材及天然植物的质量控制提供依据。梁瑾等^[55]应用HPLC-DAD-ELSD联用技术对黄芪药材进行了指纹图谱研究,从HPLC-DAD指纹图谱中找到14个共有峰,HPLC-ELSD指纹图谱中找到9个共有峰,该方法准确可靠,一次进样即可建立HPLC-DAD-ELSD指纹图谱,可同时对黄芪药材中黄酮类成分及皂苷类成分进行相似度评价和质量控制,对黄芪药材质量及天然植物质量控制具有重要的参考意义。

此外,为了使中药的质控标准更好地保证每批药品的临床使用安全有效,避免基于化学成分的定量定性分析的质量评价模式由于中药本身复杂性,不能完全满足中药质量控制的需求,有必要在现有含量测定的基础上增加生物活性测定^[52]和药材配伍所引起的化学成分的药效发生变化的测定^[56],以综合评价其质量,该评价法是评价中药有效性的重要辅助方法,在某些中药的质量控制和评价中具有独到的优势。

3.2.3 亟待建立安全评价指标和检测方法

款冬花中含有吡咯里西啶生物碱(PAs),PAs是目前已知最重要的植物性肝毒成分。为此,WHO专门制定了关于PAs的安全指南^[57]。许多国家卫生部门对此也制定了严格的质量标准。如德国联邦卫生部制定规定^[58],内服款冬花等含有PAs的植物药制剂,每天摄取量不得超过1 μg,外用不得超过100 μg;款冬花作为草药茶剂每日可允许剂量的上限为10 μg;草药如遵医嘱,日剂量0.1~1 μg内服或10~100 μg外用时,每年服用期3总计不得超过

6周。比利时建议植物中HPAs应限定在1 μg/kg。澳大利亚则严格禁止使用含有PAs的款冬花等植物。美国卫生部门规定:所有含有HPAs的制剂仅限于外用,勿用于破损皮肤,孕期哺乳期禁止使用^[59]。

针对中药肝脏的不良反应问题,需要一种高效的中药临床前安全性评价方法与技术体系研究中药的毒性问题。回连强等^[60]建立了一套精密肝切片培养技术,对款冬花总生物碱进行体外肝脏毒性观察,对照进行了款冬花水煎液的小鼠体内肝脏毒性试验,为中药肝毒性早起预警提供新的技术手段。

在款冬花的利用方面,应根据我国实际用药情况,对款冬花等药材中的肝毒性吡咯里西啶生物碱,加强中药不同提取方法及其工艺的研究,从而找到能够减弱或消除其中HPAs毒性的方法^[61],寻求高效的检测方法,确定合理的最大限量,可为中药肝脏毒性早期预警提供新的技术手段。

4 结语

款冬花是一种常用于止咳、平喘、祛痰的中药。目前对款冬花进行质量控制方面的基础研究主要集中在化学成分含量测试,以及应用HPLC法建立指纹图谱等。由于已有的质量标准仅限制于款冬酮、芦丁、槲皮素等几种组分单独控制,未对控制组分进行系统筛选,也未对组分间关联度进行分析评价;款冬花所含生物碱具有肝毒性,亦未对其建立灵敏高效的检测和含量测定方法;款冬花指纹图谱技术研究离应用尚有距离,还须加强。因此,针对上述问题全面分析款冬花化学组分与质量和毒性的相关性,建立快速、灵敏、可靠的现代分析检测手段和方法,构建系统完善的质控体系,使款冬花的药用价值得到更好的体现和应用,是深化基于款冬花的药物研发和综合利用的基础和前提。

参考文献

- 1 Chinese Pharmacopoeia Commission (国家药典委员会). Pharmacopoeia of the People's Republic of China. (中华人民共和国药典). Beijing: People's Medical publishing House, 2010. Vol I, 312.
- 2 Kaloshina NA, Konopleva MM. Phytochemical study of colts-foot grow in the Belorussian. *Sb Nauch Tr Vitebsk Gos Med Inst*, 1971, 14:319.
- 3 Kikuchi M, NoriKo Suzuki. Studies on the constituents of *Tussilago farfara* L. II: structures of new sesquiterpenoids isolated from the flower buds. *Chen Pham Bull*, 1992, 40:

- 2753.
- 4 Wei Li, *et al.* New sesquiterpenoids from the dried flower buds of *Tussilago farfara* and their inhibition on NO production in LPS-induced RAW264.7 cell. *Fitoterapia*, 2012, 83: 318-322.
 - 5 Luethy J, *et al.* Pyrrolizidine alkaloids in colts (*Tussilago farfara* L.) of various sources. *Mitt Geb Lebenlum Hyg* 1980, 71:73.
 - 6 Pu SB(濮社班), *et al.* The detection of hepatotoxic pyrrolizidine alkaloids in *Flos farfarae* by LC/MS. *Chin J Nat Med* (中国天然药物), 2004, 2:293.
 - 7 Roder EH, Wiedenfeld E. Tussilagone-a new pyrrolizidine alkaloid from *Tussilago farfara*. *Planta Med*, 1981, 43:99.
 - 8 Suzuki N, Kikuchi M. Studies on the constituents of *Tussilago farfara* L on the components of the essential oil. *Yakugaku Zasshi*, 1992, 8:571.
 - 9 Gao HQ(高慧琴), *et al.* 栽培品款冬花止咳化痰作用研究. *J. Gansu College of TCM*, 2001, 18(4):20-22.
 - 10 Ling S(凌珊), *et al.* Antitussive and Expectorant Activity of Different Extracts from the Crude and Honey-stir-baked *Tussilago farfara* Flower. *Chin J Exp Tradit Med Form*(中国实验方剂学杂志), 2013, 19:187-190.
 - 11 Cai YH(蔡颖红), *et al.* Inhibition of crude extracts of ten common anti-asthma traditional Chinese medicines towards phosphodiesterase 4. *Drug Evaluation Research*, 2012, 35: 345-347.
 - 12 Zhu ZP(朱自平), *et al.* Experimental study on anti-inflammatory and effect on the digestive system of *Tussilago Farfara* L. . *Chin J Trad Med Sci Tech*, 1998, 5:160-162.
 - 13 Zhang XC(张秀昌), *et al.* Apoptosis of K562 cells induced by *Flos Farfarae* polysaccharide *in vitro*. *CRTER*(中国组织工程研究与康复), 2007, 11:2029-2031.
 - 14 Cheol Hwangbo, *et al.* The anti-inflammatory effect of tussilagone from *Tussilago farfara* is mediated by the induction of heme oxygenase-1 in murine macrophages. *International Immunopharmacology*, 2009, 2:1578-1584.
 - 15 Ukiya M, *et al.* Constituent of compositae plants III, anti-tumor promoting effects and cytotoxic activity against human cancer cell lines of triterpene diols and triols from edible chrysanthemum flowers. *Cancer Lett*, 2002, 177:7.
 - 16 Wang BX(王本祥). Pharmacology and clinical of Chinese traditional medicine. Tianjin: Tianjin Science & Technology Translation Press, 2004. 1499.
 - 17 Han GQ(韩桂秋), Yang YJ(杨燕军), Li CL(李长龄). The investigation of principles against platelet activating factor (PAF) from *Tussilago farfara* L. . *J Beijing Univ TCM* (北京中医药大学学报), 1987, 19:33-35.
 - 18 Pu SB(濮社班), *et al.* The detection of hepatotoxic pyrrolizidine alkaloids in *Flos farfarae* by LC/MSⁿ. *CJNM*, 2004, 2: 293-297.
 - 19 Zhang Y(张燕), *et al.* Hepatotoxicity of *FlosFarfarae* and the contained alkaloid to mice. *Lishizhen Med Mater Med Res* (时珍国医国药), 2008, 19:1810-1811.
 - 20 Liu YF(刘玉峰), Yang XW(杨秀伟). RP-HPLC determination of tussilagone in *Flos Farfarae*. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2009, 29:31-34.
 - 21 Zheng XY(郑兴宇), *et al.* Supercritical CO₂ extraction of tussilagone from *Flos Farfarae*. *J Shanxi Med Univ*(山西医科大学学报), 2009, 40:906-908.
 - 22 Gamiz-gracla L, De Castro Mel. Continuous subcritical water extraction of medicinal plant essential oil comparison with conventional techniques. *Talanta*, 2000, 51:1179-1185.
 - 23 Ong ES, Len SM. Pressurized hot water extraction of berberine, baicalein and glycyrrhizin in medicina plants. *Anal Chin Acta*, 2003, 482:81-89.
 - 24 Wang DJ, *et al.* Preparative separation and purification of sesquiterpenoids from *Tussilago farfara* L. by high-speed counter-current chromatography. *Quim Nova*, 2011, 34:804-807.
 - 25 Li Y(李月), Liu Y(刘妍). Study on microwave-assisted extraction of total flavones from *Tussilago Farfara* L. Flowers. *Chemistry & Bioengineering* (化学与生物工程), 2010, 27(11):43-46.
 - 26 Li XR(李小蓉), *et al.* Study on ultrasonic extraction process of flavonoids from *Tussilago farfara*. *Guiding J TCM Pharm* (中医药导报), 2011, 11:101-104.
 - 27 Wang S(王松), *et al.* Study on the continuous counter-current extraction of soybean isoflavones. *Food Sci Tech*(食品科技), 2005(8):19-23.
 - 28 Ding CL(丁彩丽), Wu MJ(吴鸣建). Study on purification of total flavones from *Tussilago farfara* with SP825 resin. *Food Sci Tech*(食品科技), 2009, 34:220-223.
 - 29 Xiao WH, *et al.* *Chromatogr. B*, 2009, 877:697-702.
 - 30 Li WT(李婉婷). Extraction purification technology process of tussilago farfara polysaccharide. Xian: Northwest University (西北大学), MSc. 2010.
 - 31 Yan QJ(闫巧娟), *et al.* Extraction of astragalus polysaccharides by cellulose. *Chin Tradit Herbal Drugs* (中草药), 2005, 36:1804.
 - 32 Gao JJ(高晶晶), *et al.* Research and comparison of several decoloring methods of polysaccharide of *Tussilago farfara*. . *Chin Trad Pat Med* (中成药), 2011, 33:1073-1075.
 - 33 Dong Y. Study on extracting and purifying Chinese traditional medicine polysaccharide by membrane separation. Tianjin: Tianjin University, MSc. 2007.
 - 34 Jiang ZJ, *et al.* Determination of senkirkinine and senecionine in *Tussilago farfara* using microwave-assisted extraction and pressurized hot water extraction with liquid chromatography

- tandem mass spectrometry. *Talanta*, 2009; 539-546.
- 35 Ouyang XK, *et al.* Preparative separation of four major alkaloids from medicinal plant of *Tripterygium Wilfordii* Hook. f. using high-speed counter-current chromatography. *Sep Purif Technol*, 2007, 56; 319-324.
- 36 Yan KY(闫克玉), *et al.* Comparisons of the two methods between steam distillation extraction and simultaneous distillation extraction for extracting the volatile oil from *Tussilago farfara* L. . *J Henan Agric Sci*(河南农业科学), 2008(7): 91-93.
- 37 Yan KY(闫克玉), *et al.* Extraction of volatile oil from *Tussilago farfara* L. and its application in cigarette. *Tobacco Sci. Tech.* (烟草科技), 2009(5): 27-33.
- 38 Liang XM, *et al.* Qualitative and quantitative analysis in quality control of traditional Chinese medicines. *J Chromatogr A*, 2009; 2033-2044.
- 39 Zhang ZW(张志伟), *et al.* Determination of tussilagonone of *Tussilago farfara* L. in different regions. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2009, (40): 285-286.
- 40 Qi LW, *et al.* Quality evaluation of *Radix Astragali* through a simultaneous determination of six major active isoflavonoids and four main saponins by high-performance liquid chromatography coupled with diode array and evaporative light scattering detectors. *J Chromatogr A*, 2006, 1134; 162-169.
- 41 Liu X(刘香), Cao J(曹娟). Determination of flavonoids in *Tussilago Farfara* L. from different areas by spectrophotometry. *J Guiyang Med Coll*(贵阳医学院学报), 2010, 35; 572-574.
- 42 Lv PL(吕培霖), *et al.* Comparative study on quality of *Tussilago farfar* L. from different areas in Gansu Province. *Chin Pharm* (中国药师), 2008, 11; 1307-1308.
- 43 Wu D(吴笛), *et al.* Simultaneous determination of rutin, isoquercitrin and chlorogenic acid in *Flos Farfarae* by HPLC. *Chin J Chin Mater Med*(中国中药杂志), 2010, 35; 2722-2725.
- 44 Ma ZJ(马致洁), *et al.* Quantitative analysis and HPLC fingerprint of quercetin and kaempferide from different *Flos Farfarae*. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 2009, 40; 1305-1308.
- 45 Wang FG(王福刚), *et al.* Determination of four flavonoids in stir-fried *Farfarae Flos* with honey by HPLC. *Chin Trad Pat Med*(中成药), 2012, 34; 1333-1336.
- 46 Xu LX(许丽霞). Determination gallic acid of *Tussilago farfara* L by HPLC. *Strait Pharm J* (海峡药学), 2009, 21(9): 53-54.
- 47 Lv PL(吕培霖), *et al.* Determination the contents of microelements of *Tussilago farfara* L in different regions. *J Chin Pharm* (中国药业), 2010, 19(10): 26-27.
- 48 Liu Y(刘毅). Study on Standardized production and quality standards of *Tussilago farfara* L. Chengdu; Chengdu University of TCM(成都中医药大学), PhD. 2008.
- 49 Pang DM(庞东梅). The Study of *Tussilago Farfara* L. quality with grey recognition in different producing regions in Gansu province. *J Math Med* (数理医药学杂志), 2011, 24; 640-642.
- 50 Roy Upton, *et al.* American herbal pharmacopoeia: Botanical pharmacognosy-microscopic characterization of botanical medicines. CRC Press, 2011. 662-665.
- 51 Zhao C(赵超), *et al.* Progress for chemical analysis and quality control of traditional Chinese medicines. *J Chin Pharm Univ*(中国药科大学学报), 2012, 43; 283-288.
- 52 Liu YF(刘玉峰), Yang XW(杨秀伟). HPLC fingerprint of chemical constituents of *Flos Farfarae*. *Acta Pharm Sin*(药学学报), 2009, 44; 510-514.
- 53 LIU Shu-min. Fingerprint determination method of *Scutellaria baicalensis*(一种黄芩药材的 UPLC-MS 指纹图谱测定方法). *CN102435689A*. 2012-5-2.
- 54 Wang GY(王国艳), *et al.* Fingerprins of *Flos Farfarae* by High Performance Capillary Electrophoresis. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2013, 19(13): 97-100.
- 55 Liang J(梁瑾), *et al.* Study on chromatography fingerprint of *Radix Astragali* with hyphenated technique of HPLC-DAD-ELSD. *Chin J Exp Tradit Med Form*(中国实验方剂学杂志), 2012, 18; 268-272.
- 56 Wang L(汪玲), *et al.* Pharmacokinetics of chlorogenic acid in rats on compatibility of extracts of *Flos fargarae* and *Asteris Radix*. *Asia-Pacific Tradit Med*, 2013, 9; 14-17.
- 57 Robins DJ. Pyrrolizidine alkaloids. *Nat Prod Rep*, 1995, 12; 413.
- 58 De Smet, *et al.* Adverse effects of herbal drugs. *Springer-verlag Berlin Hidelberg*, 1992, (1): 191-206.
- 59 Subhuti Dharmanand. Safety Issue Affecting Herbs; Pyrrolizidine Alkaloids (<http://.itmonline.org/arts/pas.htm> 2001).
- 60 Hui LQ(回连强), *et al.* Hepatotoxicity on water extracts and the total alkaloid of *Farfarae Flos*. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2012, 18; 238-241.
- 61 Liu KY(刘可越), *et al.* Phytochemical and pharmacological research progress in *Tussilago farfara*. *Chin J Chin Mater Med*(中国中药杂志), 2006, 31; 1837-1841.