

## 不同炮制方法对蒙古族药狼毒毒效的影响

李佟拉嘎<sup>1</sup>, 于欢<sup>1\*</sup>, 龚千锋<sup>1\*</sup>, 奥·乌力吉<sup>2</sup>, 王秀兰<sup>2</sup>

(1. 江西中医药大学, 南昌 330004; 2. 内蒙古民族大学, 内蒙古 通辽 028000)

**[摘要]** **目的:**探讨蒙古族药狼毒炮制减毒药性理论的科学性,了解其炮制前后药效变化,并建立各样品中岩大戟内酯 B 和狼毒乙素含量测定的 RP-HPLC。**方法:**采用 HPLC-Q-TOF/MS 技术比较蒙古族药狼毒炮制前后的成分差异;通过正常小鼠的急性毒性作用及泻下作用比较炮制对该药材毒性和药效的影响,利用 RP-HPLC 测定蒙古族药狼毒及其炮制品中岩大戟内酯 B 和狼毒乙素的含量,流动相乙腈(A)-0.1%冰乙酸水溶液(B)梯度洗脱(0~5 min,40% A;5~10 min,40%~50% A;10~30 min,50%~55% A;30~40 min,55%~60% A;40~45 min,60%~70% A),检测波长 250 nm,柱温 30 ℃。**结果:**与生品相比,蒙古族药狼毒在炮制后奶制品、诃子汤制品、酒制品中分别有 30,20,21 个峰的含量降低。狼毒生品及奶、酒、诃子汤制品粉末的半数致死量分别为 2.694,3.642,3.461,4.309 g·kg<sup>-1</sup>。药效试验表明药物粉末给药剂量为 0.53,0.133 g·kg<sup>-1</sup>时,狼毒生品及其各炮制品均能明显提高小鼠小肠墨汁推进率。狼毒中狼毒乙素和岩大戟内酯 B 的线性范围分别为 0.060 12~1.202 4,0.060 72~1.214 4 μg,平均加样回收率分别为 107.55% (RSD 4.7%) 和 103.03% (RSD 3.6%)。**结论:**蒙古族药狼毒不同方法炮制后其化学成分含量会不同程度降低,进而可能会降低部分刺激性成分含量或使其转化为毒性较小成分,从而降低了其毒性。蒙古族药狼毒炮制后的粉末较未经炮制的粉末毒性降低,炮制后对该药材的泻下作用无影响,即炮制可减毒保效。狼毒炮制机制可能与炮制后化学成分含量变化有关。建立的 HPLC 准确可靠、重复性好,可用于蒙古族药狼毒及其炮制品中岩大戟内酯 B 和狼毒乙素的含量测定。

**[关键词]** 蒙古族药; 狼毒; 炮制; 毒性; 药效; 岩大戟内酯 B

**[中图分类号]** R283.3;R943.1;R284.1;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)22-0027-05

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2017220027

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170906.1335.016.html>

**[网络出版时间]** 2017-09-06 13:35

## Effect of Different Processing Methods on Toxicity and Efficacy of *Euphorbia fischeriana* Dry Roots

LITONG La-ga<sup>1</sup>, YU Huan<sup>1\*</sup>, GONG Qian-feng<sup>1\*</sup>, AO Wu-li-ji<sup>2</sup>, WANG Xiu-lan<sup>2</sup>

(1. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China;

2. Inner Mongolia University for Nationalities, Tongliao 028000, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study on the scientificity of theory of reducing toxicity by processing for *Euphorbia fischeriana* dry roots, and understand its pharmacodynamic changes before and after processing, and develop a RP-HPLC for the simultaneous determination of jolkinolide B and 2, 4-dihydroxy-6-methoxy-3-methylacetophenone in *E. fischeriana* dry roots and its processed products. **Method:** HPLC-Q-TOF/MS was employed to compare composition differences of *E. fischeriana* dry roots before and after processing, the acute toxicity and diarrhea of *E. fischeriana* dry roots on the normal mice before and after processing was compared, and RP-HPLC was adopted to determine the contents of jolkinolide B and 2, 4-dihydroxy-6-methoxy-3-

**[收稿日期]** 20170406(006)

**[基金项目]** 内蒙古自治区蒙医药科技重大专项(GCY20161219)

**[第一作者]** 李佟拉嘎,在读博士,从事中药饮片质量与炮制机制研究,Tel:15894864839,E-mail:litonglaga@163.com

**[通讯作者]** \*于欢,讲师,从事中药炮制学研究,E-mail:yuhuanhebei@163.com; \*龚千锋,博士生导师,教授,从事中药炮制传承、饮片质量标准与炮制机制研究,Tel:0791-87118852,E-mail:gongqf2002@163.com

methylacetophenone in this herb and its different processed products. **Result:** Compared with the raw products, the contents of 30, 20, 21 peaks were decreased in milchigs products, Chebulae Fructus soup products and wine products; LD<sub>50</sub> of raw products, milchigs products, Chebulae Fructus soup products and wine products were 2.694, 3.642, 4.309, 3.461 g·kg<sup>-1</sup>, respectively. When the dosages of drug powder were 0.53, 0.133 g·kg<sup>-1</sup>, the raw products and its processing products all could significantly improve intestinal propulsive rate. Jolkinolide B and 2, 4-dihydroxy-6-methoxy-3-methylacetophenone were linear in the ranges of 0.060 72-1.214 4, 0.060 12-1.202 4 μg, their average recoveries were 103.03% with RSD of 3.6% and 107.55% with RSD of 4.7%. **Conclusion:** The processing mechanism of *E. fischeriana* dry roots may be related to the changes of chemical components after processing. The determination of two components in this herb and its processed products is accurate and reliable with good reproducibility, it can be used for the quality control of *E. fischeriana* dry roots and its processed products.

[**Key words**] Mongolian medicine; *Euphorbia fischeriana* dry roots; processing; toxicity; efficacy; jolkinolide B

蒙古族药狼毒又名伊和-如罕布等,味辛,性温,具有泻下、消肿、消奇哈、燥协日乌素、杀黏虫的功效。蒙古族医生用来治疗白喉、炭疽、黏肿、协日乌素疮、疥癣、水肿、陶赖、赫如虎、协日乌素病等。该药材生于山坡及山野向阳处,分布于内蒙古、河北、山西等地<sup>[1-2]</sup>。该药材传统炮制方法有奶制、酒制、诃子汤制、童子尿制、母牛尿液制及山羊肉汤制等<sup>[3]</sup>。蒙古族药炮制技术是前人经过不懈的努力和探索不断积累下来的宝贵技艺和文化结晶,在继承和延续传统炮制方法的同时,应对其进行现代化研究。大量研究资料显示,狼毒主要含有二萜类和苯乙酮类化合物,二萜类化合物岩大戟内酯 B 具有抑制肿瘤的药效<sup>[4-7]</sup>,其中苯乙酮类化合物狼毒乙素对结核菌的抑菌作用显著,在临床上用于治疗肺结核<sup>[8]</sup>。目前,除了醋制以外,尚无关于蒙古族药狼毒传统炮制方法的研究报道。本实验拟对狼毒的减毒保效机制进行探索,比较不同炮制方法对狼毒中有效成分含量的影响,分析炮制前后狼毒对小鼠急性毒性及泻下作用的影响,以期佐证蒙古族药传统炮制方法的科学性和合理性,并为其临床合理用药提供科学依据。

## 1 材料

1260 型高效液相色谱系统(美国安捷伦公司), Triple TOF 5600 型飞行时间高分辨质谱仪(美国 AB Sciex 公司)。狼毒于 2016 年 5 月采自内蒙古通辽市扎鲁特旗前进镇,经内蒙古民族大学布和巴特尔教授鉴定为大戟科植物狼毒大戟 *Euphorbia fischeriana* 的干燥根;狼毒乙素对照品(中国食品药品检定研究院,批号 111932-201201,纯度 98%),岩大戟内酯 B 对照品(上海同田生物技术股份有限公

司,批号 16062921,纯度 98%),红星二锅头(北京红星股份有限公司,批号 GB/T20822),鲜牛奶(江西阳光乳业股份有限公司,批号 20161019),金诃子(安徽松山堂国药股份有限公司,批号 20160665),羧甲基纤维素钠(国药集团化学试剂有限公司,批号 20140806),乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

SPF 级昆明种小鼠,雌雄各半,6~8 周龄,体重 18~22 g,由长春市亿斯实验动物技术有限责任公司提供,合格证号 SCXK(吉)2016-0003,经内蒙古民族大学附属医院医学伦理委员会批准后进行动物实验,批准号 NM-LL-2016-11-12-07。

## 2 方法与结果

**2.1 药材的炮制<sup>[3]</sup>** 称取一定量狼毒,加 8 倍量牛奶、酒及诃子汤,用文火煮至辅料被吸尽时取出,晒干,粉碎过 100 目筛,待用。

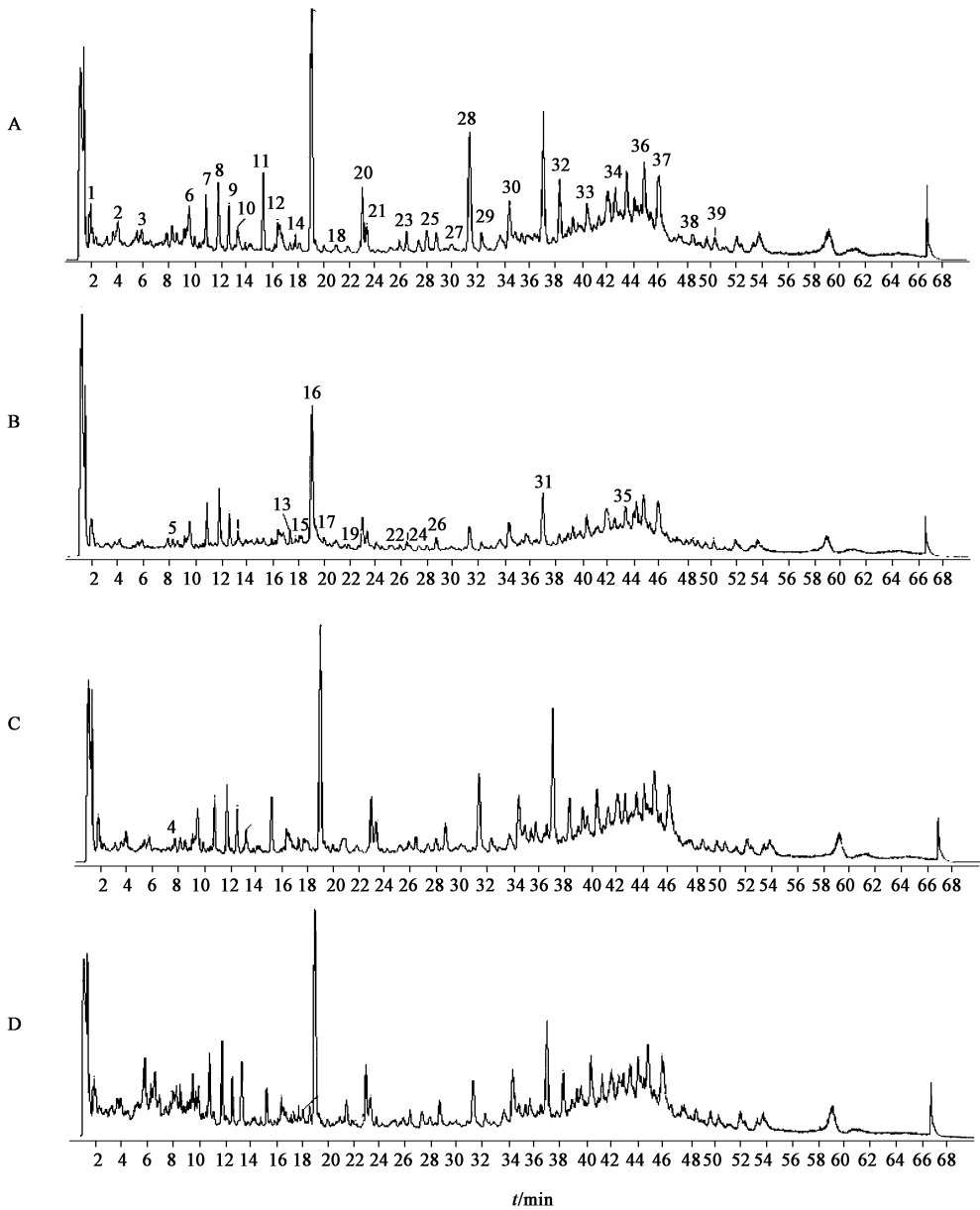
**2.2 HPLC-ESI-Q-TOF 比较炮制对狼毒成分群的影响**

**2.2.1 色谱条件** Unitary-C<sub>18</sub> 色谱柱(2.1 mm × 150 mm, 2.8 μm),柱温 20 °C,流动相 0.1% 甲酸水溶液(A)-乙腈(B)梯度洗脱(0~30 min, 10%~55% B; 30~45 min, 55%~90% B; 45~65 min, 90%~95% B),流速 0.4 mL·min<sup>-1</sup>,检测波长 254 nm。

**2.2.2 色谱条件** 正离子模式,离子源喷雾电压 5.5 kV,离子源温度设定 600 °C,裂解电压(DP)设定 -100 V,碰撞能量(CE)40 eV,碰撞能量扩展(CES)10 eV,雾化气体为超高纯度氮气,辅助气 1(GS1)压力 60 Pa,辅助气 2(GS2)压力 60 Pa,气帘气(CUR)压力 35 Pa。信息依赖性扫描(IDA)设置响应值超过 100 mDa 的 6 个最高峰进行二级质谱扫描,开启动态背景扣除(DBS);质谱扫描范围 m/z

50 ~ 1 700。生品及各炮制品总离子流见图 1。结果发现生品及各炮制品中有 39 个稳定的共有峰,与生

品相比,奶制品、诃子汤制品及酒制品中含量降低的色谱峰分别有 30,20,21 个。



A. 生品; B. 奶制品; C. 酒制品; D. 诃子汤制品

图 1 狼毒生品及炮制品 HPLC-Q-TOF/MS 的总离子流

Fig. 1 Total ion chromatograms of raw and processed products of *Euphorbia fischeriana* dry roots by HPLC-Q-TOF/MS

**2.3 不同炮制品的急性毒性比较** 取昆明种小鼠 200 只,按体重随机分为生品组、奶制品组、酒制品组、诃子汤制品组共 4 组,每个样品组分为 5 个剂量组,每剂量组 10 只。实验前小鼠禁食不禁水 16 h 后,各组动物灌胃相应的药物溶液 1 次,给药后观察小鼠一般状态及体重。死亡小鼠立即解剖,肉眼观察毒性靶器官。记录小鼠 14 d 内的死亡数量,采用 Bliss 法计算半数致死量 ( $LD_{50}$ )。结果蒙古族药狼毒生品及奶、酒、诃子汤制品粉末的  $LD_{50}$  分别为

2.694, 3.642, 3.461, 4.309  $g \cdot kg^{-1}$ 。

**2.4 炮制前后体内药效作用观察** 取 100 只昆明种小鼠,按体重随机分为 0.5% 羧甲基纤维素钠溶液组,阳性药组 (10% 无水硫酸钠溶液),狼毒生品高、低剂量组 (0.53, 0.133  $g \cdot kg^{-1}$ ),狼毒奶制品高、低剂量组 (0.53, 0.133  $g \cdot kg^{-1}$ ),狼毒酒制品高、低剂量组 (0.53, 0.133  $g \cdot kg^{-1}$ ) 和狼毒诃子汤制品高、低剂量组 (0.53, 0.133  $g \cdot kg^{-1}$ ) 共 10 组,每组 10 只。各组动物灌胃给予相应药物溶液 1 次,给药

15 min后脱颈处死,打开腹腔分离肠系膜,剪取上端至幽门,下端至盲部的肠管,置于托盘上轻轻摆成直线,利用直尺测量所取肠管首尾长度,即小肠总长度,测量从幽门至墨汁前沿的距离作为墨汁推进距离,计算墨汁推进率,并注意观察各组小肠容积膨胀程度差异,见表 1。结果表明与 0.5% 羧甲基纤维素钠组比较,狼毒生品及各炮制品组均能明显提高小鼠的小肠墨汁推进率;狼毒生品与各炮制品组比较无统计学意义。

$$\text{墨汁推进率} = \frac{\text{墨汁推进距离}}{\text{小肠总长度}} \times 100\%$$

表 1 各组狼毒样品对小鼠小肠推进率的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 1 Effect of different samples of *Euphorbia fischeriana* dry roots on small intestinal propulsion in mice( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	墨汁推进率/%	肠容积变化
0.5% 羧甲基纤维素钠	0.010	44.87 ± 4.05	基本无变化
10% 无水硫酸钠溶液	2.000	80.67 ± 18.08 <sup>2)</sup>	明显膨胀
生品高剂量	0.530	75.18 ± 11.10 <sup>2)</sup>	稍微膨胀
生品低剂量	0.133	66.27 ± 7.15 <sup>2)</sup>	基本无变化
酒制品高剂量	0.530	77.01 ± 15.40 <sup>2)</sup>	稍微膨胀
酒制品低剂量	0.133	65.53 ± 12.40 <sup>2)</sup>	基本无变化
奶制品高剂量	0.530	77.54 ± 15.93 <sup>2)</sup>	基本无变化
奶制品低剂量	0.133	61.41 ± 8.47 <sup>2)</sup>	基本无变化
诃子汤制品高剂量	0.530	74.11 ± 17.12 <sup>2)</sup>	稍微膨胀
诃子汤制品低剂量	0.133	58.04 ± 12.10 <sup>1)</sup>	基本无变化

注:与 0.5% 羧甲基纤维素钠组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup>  $P < 0.01$ 。

## 2.5 岩大戟内酯 B 和狼毒乙素的含量测定

### 2.5.1 色谱条件

Hypersil ODS 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈(A)-0.1% 冰乙酸水溶液(B)梯度洗脱(0~5 min,40% A;5~10 min,40%~50% A;10~30 min,50%~55% A;30~40 min,55%~60% A;40~45 min,60%~70% A),柱温 30 °C,检测波长 250 nm,流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>,进样量 10 μL。

### 2.5.2 对照品溶液的制备

精密称取岩大戟内酯 B 和狼毒乙素对照品适量,加乙醇溶解并定容至刻度,摇匀,得质量浓度分别为 506.0,501.0 mg·L<sup>-1</sup> 的混合对照品溶液,置于 4 °C 冰箱密闭,临用时冷却至室温。

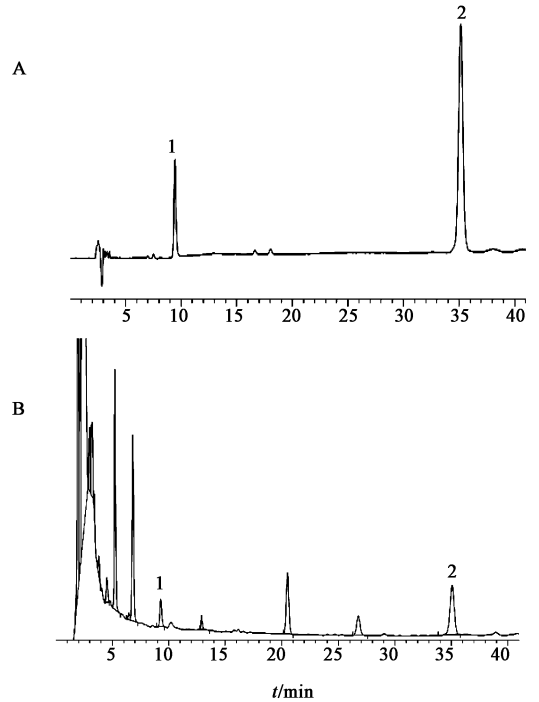
### 2.5.3 供试品溶液的制备

取生品及各炮制品粉末(过 4 号筛)约 1 g,精密称定,加 70% 乙醇 25 mL,称定质量,超声(200 W,40 kHz)处理 30 min,冷却至室温,称定质量,加 70% 乙醇补足缺失的质量,过滤,取续滤液,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得。

### 2.5.4 专属性考察

取混合对照品溶液和供试品

溶液适量,按 2.5.1 项下色谱条件测定,见图 2。岩大戟内酯 B 和狼毒乙素的保留时间分别为 9.2,35.0 min,各色谱峰的分离度均符合要求。



A. 对照品;B. 供试品;1. 狼毒乙素;2. 岩大戟内酯 B

图 2 狼毒奶制品的 RP-HPLC

Fig. 2 RP-HPLC of milchigs products of *Euphorbia fischeriana* dry roots

### 2.5.5 线性关系考察

精密量取狼毒乙素和岩大戟内酯 B 对照品贮备液适量,加乙醇制成质量浓度分别为 100.2,101.2 mg·L<sup>-1</sup> 的混合对照品溶液①;精密量取混合对照品溶液①加乙醇制成质量浓度分别为 5.01,5.06 mg·L<sup>-1</sup> 的混合对照品溶液②。分别精密吸取混合对照品溶液②12 μL 和混合对照品溶液①1,2,4,8,10,12 μL 进样分析,按 2.5.1 项下色谱条件测定,以进样量为横坐标,峰面积为纵坐标,得狼毒乙素、岩大戟内酯 B 的回归方程分别为  $Y = 266.88X - 0.356$  ( $R^2 = 0.9999$ ),  $Y = 1286.4X - 4.021$  ( $R^2 = 0.9998$ ),线性范围分别为 0.06012~1.2024,0.06072~1.2144 μg。

### 2.5.6 精密度试验

精密吸取 2.5.2 项下混合对照品溶液 10 μL,按 2.5.1 项下色谱条件连续进样 6 次,记录峰面积并计算岩大戟内酯 B 和狼毒乙素的峰面积 RSD 分别为 0.6% 和 1.3%,表明仪器精密度良好。

### 2.5.7 稳定性试验

取同一供试品溶液,分别于 0,1,4,8,12,24 h 按 2.5.1 项下色谱条件进样 1 次,计算岩大戟内酯 B 和狼毒乙素的峰面积 RSD 分别

为 2.1% 和 1.2% ,表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

**2.5.8 重复性试验** 取同一批狼毒供试品 6 份,按 2.5.3 项下方法制备供试品溶液,按 2.5.1 项下色谱条件测定,计算岩大戟内酯 B 和狼毒乙素质量分数分别为 0.04% 和 0.06% ,RSD 分别为 2.9% 和 2.6% ,表明该方法重复性良好。

**2.5.9 加样回收率试验** 取已知指标成分含量的奶制品 6 份,每份约 0.5 g,精密加入  $291.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  狼毒乙素对照品溶液和  $202.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  岩大戟内酯 B 对照品溶液各 1.0 mL,按 2.5.3 项下方法制备供试品溶液,按 2.5.1 项色谱条件测定,计算加样回收率分别为 107.55% 和 103.03% ,RSD 依次为 4.7% 和 3.6% 。

**2.5.10 样品测定** 取狼毒生品及奶、酒、诃子汤制品适量,按 2.5.3 项下方法制备供试品溶液,按 2.5.1 项色谱条件测定,采用外标一点法计算,结果样品中岩大戟内酯 B 质量分数分别为 0.05% ,0.04% ,0.05% ,0.04% ,狼毒乙素的质量分数依次为 0.06% ,0.04% ,0.06% ,0.07% 。

### 3 讨论

本文以蒙古族药狼毒及其炮制品为研究对象,从整体化学成分含量、岩大戟内酯 B 和狼毒乙素含量、急性毒性作用、泻下作用等方面来探讨狼毒减毒保效机制。结果发现奶制、酒制、诃子汤制狼毒后整体化学成分含量降低,与狼毒生品比较,奶制品中有 30 个色谱峰含量降低,诃子汤制品中有 20 个色谱峰含量降低,而酒制品中有 21 个色谱峰含量降低。

本研究结果显示狼毒经奶、酒、诃子汤炮制后整体化学成分含量较生品显著降低,这种现象可能与狼毒炮制过程中在高温情况下与牛奶、酒及诃子汤产生相互作用而增加了狼毒药材细胞间隙,加速其化学成分的溶出速度有关,至于狼毒整体化学成分含量降低的具体机制尚有待进一步研究证实。毒理

实验结果表明狼毒奶、酒、诃子汤炮制后能降低急性毒性,这可能与炮制加速其刺激性成分的溶出速度有关。

毒性蒙古族药减毒增效可能与炮制加速其毒性成分或刺激性成分的溶出有关。但目前尚未见到对蒙古族药狼毒及其炮制品的相关研究,炮制机制尚不明确,有待于进一步结合现代医学技术进行深入研究,明确炮制机制。狼毒经奶、酒、诃子汤炮制后,其整体成分含量及毒性降低,泻下作用却无显著改变,这在一定程度上可为解决毒性蒙古族药的临床合理应用问题提供科学依据。

#### [参考文献]

- [1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草. 蒙药卷[M]. 上海:上海科学技术出版社,2004:325.
- [2] 罗布桑. 蒙药学[M]. 呼和浩特:内蒙古人民出版社,2006:337-338.
- [3] 丹增措措. 炮制明藏[M]. 赤峰:内蒙古科学技术出版社,2013:88-90.
- [4] SUN C H, CUI H X, YANG H Y, et al. Anti-metastatic effect of jolkinolide B and the mechanism of activity in breast cancer MDA-MB-231 cells[J]. Oncol Lett, 2015, 10(2):1117-1122.
- [5] 林宇,田华. 岩大戟内酯 B 诱导乳腺癌细胞凋亡的实验研究[J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2015, 36(30):4527-4528.
- [6] WANG J H, ZHANG K, NIU H Y, et al. Jolkinolide B from *Euphorbia fischeriana* Steud induces apoptosis in human leukemic cells via JAK2/STAT3 pathways[J]. Int J Clin Pharmacol Ther, 2013, 51(3):170-178.
- [7] 林宇,岳丽玲,蒋丽艳. 岩大戟内酯 B 对人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞增殖的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(3):132-136.
- [8] 王灿坚,江英桥,毕福钧,等. RP-HPLC 法测定狼毒中狼毒乙素和岩大戟内酯 B 的含量[J]. 药物分析杂志, 2011, 31(5):839-842.

[责任编辑 刘德文]