

醋狼毒饮片质量标准研究

邓英君^{1*}, 庄果², 汪兰云², 李俊松^{2*}, 蔡宝昌^{2*}, 葛乃贵³

(1. 南京市中医院, 南京 210001; 2. 南京中医药大学江苏省中药炮制重点实验室, 南京 210029;
3. 江苏省海安针灸推拿学校, 江苏南通 226600)

[摘要] 目的: 制订醋狼毒饮片的质量标准。方法: 收集炮制 10 批醋狼毒饮片, 对水分、总灰分、酸不溶性灰分、浸出物进行测定, 并以狼毒乙素含量为指标进行含量测定。结果: 拟定醋狼毒饮片水分不得超过 9.12%, 总灰分不得超过 6.50%, 酸不溶性灰分不得超过 1.09%, 醇溶性浸出物不少于 7.70%, 狼毒乙素含量不少于 0.038%。结论: 初步建立醋狼毒饮片量化质控标准评价体系。

[关键词] 醋狼毒; 质量标准; 含量测定

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2012)23-0098-04

Study on Quality Standard of Vinegar Backed *Euphorbia Ebracteolata*

DENG Ying-jun^{1*}, ZHUANG Guo², WANG Lan-yun², LI Jun-song^{2*}, CAI Bao-chang^{2*}, GE Nai-gui³

(1. Nanjing Hospital of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210001, China;
2. Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Jiangsu Key Laboratory of Chinese Medicine Processing, National First-Class Key Discipline for Traditional Chinese Medicine of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China;
3. Jiangsu Province Hai'an Acupuncture Massage School, Nantong 226600, China)

[Abstract] **Objective:** To revise and improve the quality standard of vinegar backed *E. ebracteolata*. **Method:** 10 batches of vinegar backed *Euphorbia ebracteolata* were investigated with TLC. Moisture content, total ash, acid-insoluble ash and extractum were explored. The content of ebracteolata cpd B was determined by HPLC. **Result:** The quality standard was preliminarily formulated as follows: the moisture content should not pass 9.12%. Total ash should not pass 6.50%. Acid-insoluble ash should not pass 1.09%. Alcohol-soluble extractive should not lower than 7.70%. The content of ebracteolata cpd B should not lower than 0.038%. **Conclusion:** Quality control quantization evaluation system of processed *E. ebracteolata* slice is preliminarily established.

[Key words] vinegar backed *Euphorbia ebracteolata*; quality standards; content

狼毒为大戟科植物狼毒大戟 *Euphorbia fischeriana* Steud、月腺大戟 *Euphorbia ebracteolata* Hayata 的根, 为一少常用毒性中药。始载于《神农本草经》, 其味辛, 性平, 有毒, 入肺、肝、脾经, 有逐水祛痰, 散结杀虫的功效^[1-2]。因其药性峻烈, 临床上常用其醋制品, 为 2010 年版《中国药典》收录品

种^[3], 但药典醋狼毒项下缺乏质量控制方法。

月腺大戟作为狼毒的主要来源之一, 其化学成分主要为苯乙酮类和二萜类成分^[4-5], 其中苯乙酮类化合物被认为是发挥其抗结核药效的主要成分, 如狼毒乙素、狼毒丙素^[5]; 二萜类化合物经研究则证明其具有抗肿瘤活性, 但同时也具有细胞毒及刺

[收稿日期] 20120626(021)

[基金项目] 国家公益性行业专项基金项目(200807039); 南京中医药大学中药学一级学科开放课题(2011ZYX2-011)

[第一作者] 邓英君, 副主任中药师, 从事中药学研究, Tel: 025-52276130, E-mail: zy2008050@sina.com

[通讯作者] * 李俊松, 研究员, 从事中药炮制与制剂研究, Tel: 025-86798281, E-mail: lijunsong1964@163.com;

* 蔡宝昌, 教授, 从事中药炮制研究, Tel: 025-86798281, E-mail: bccai@126.com

激性等毒副作用^[7-9]。

本文通过对不同来源醋狼毒进行水分、灰分、酸不溶性灰分、醇溶性浸出物等检查项的测定,并以狼毒乙素为指标性成分进行含量测定,建立醋狼毒的质量标准。

1 仪器与试药

1.1 仪器 NiKon YS100 型光学显微镜(日本), Agilent1100 型四元泵全自动进样高效液相色谱仪(Agilent 公司), DAD 型检测器, Alltech 2000Es 型检测器, AG285 型电子天平(瑞士 METTLER 公司), V800 型旋转蒸发仪(瑞士 BUCHI 公司), KQ-3200E 型超声清洗器(昆山市超声仪器有限公司), 薄层色谱系统(瑞士 GAMAG 公司), 硅胶 G 板(青岛海洋化工厂分厂, 批号 20111203)。

1.2 试药 狼毒药材经本校中药鉴定教研室刘训红教授鉴定为大戟科大戟属植物月腺大戟的干燥块根; 样品 1~7 号的醋炙饮片为本实验室按前期研究获得的优化工艺自制^[10-11], 即辅料醋用量为 40%, 闷润 1 h 至醋被吸收干净, 160 °C 下炒制 10 min 即得; 样品 8~10 号为南京海昌中药饮片公司按本实验室提供方法炮制所得的中试产品, 样品来源见表 1。

表 1 样品来源

No.	批号	生产厂商	产地	收集时间
1	110307	亳州市华荣堂	安徽	2011-12
2	111208	亳州市中正	新疆	2011-12
3	111101	安徽福春堂	湖北	2011-12
4	110507	亳州市真源堂	河南	2011-12
5	110414	亳州市三义堂	山东	2011-12
6	110823	亳州市永刚	河南	2011-12
7	110613	亳州市四芝堂	山东	2011-12
8	120210	南京海昌	安徽	2012-2
9	120210	南京海昌	陕西	2012-2
10	120210	南京海昌	浙江	2012-2

月腺大戟对照药材(批号 129611-200303), 狼毒乙素对照品为本实验室自制, 其纯度 >99.0%。乙腈为色谱纯(美国 Tidea 公司), 甲醇为分析纯, 乙腈为色谱纯, 水为娃哈哈纯净水, 醋为江苏镇江恒顺香醋(总酸量 ≥4.5 g/100 mL), 水为重蒸水。

2 方法和结果

2.1 粉末显微鉴别 参照 2010 版《中国药典》一部附录显微鉴别法(附录 II C), 对醋狼毒饮片粉末的显微特征进行了研究, 其特征可描述为: 本品粉末黄白色。淀粉粒甚多, 单粒球形、长圆形或半圆形,

直径 3~34 μm, 脐点裂隙状、人字状或圆点状、三叉状, 大粒层纹隐约可见; 复粒由 2~8 分粒组成; 半复粒易见; 厚壁细胞长方形、类方形、卵形或长条形; 具有网状具缘纹孔导管、具缘纹孔导管及网纹导管; 无节乳管多破碎, 有时可见乳管内黄色分泌物存在; 木栓细胞淡黄色, 多角形或延长, 微木化。见图 1。

2.2 薄层色谱鉴别 取本品粗粉 2 g, 加乙醇 30 mL, 加热回流 1 h, 放冷, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加甲醇 2 mL 使溶解, 作为供试品溶液, 另取月腺大戟对照药材 2 g, 同法制成对照药材溶液, 照 2010 年版《中国药典》一部附录薄层色谱法(附录 VI B)试验, 吸取上述两种溶液各 2 μL, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以环己烷-乙酸乙酯(8.5:1.5)为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以 10% 硫酸乙醇溶液, 在 105 °C 加热至斑点显色清晰, 置紫外灯(365 nm)下检视。供试品色谱中, 在与对照药材色谱相应的位置上, 显相同颜色的荧光斑点。

2.3 检查

2.3.1 水分测定 照 2010 年版《中国药典》一部附录水分测定法(附录 IX H 第一法), 对 10 批狼毒饮片及醋狼毒饮片进行测定。10 批醋狼毒饮片的水分平均为 7.60%, 其中最低为 3.30%, 最高为 10.30%。

2.3.2 灰分及酸不溶性灰分的测定 按照 2010 年版《中国药典》一部附录灰分测定法(附录 IX K), 对醋狼毒饮片进行灰分及酸不溶性灰分测定。10 批醋狼毒饮片的总灰分平均值为 5.41%, 其中总灰分最低值为 4.74%, 最高值为 6.24%。醋狼毒饮片的酸不溶性灰分的平均值为 0.91%, 最低值为 0.74%, 最高为 1.14%。

2.3.3 浸出物测定 按 2010 年版《中国药典》一部附录醇溶性浸出物测定法(附录 X A)项下的热浸法测定, 用 70% 乙醇为溶剂。对 10 批次的醋狼毒样品进行测定。结果显示, 醇浸出物平均值为 9.24%, 最低为 7.36%, 最高为 11.18%。

2.4 HPLC 测定醋狼毒饮片中狼毒乙素含量

2.4.1 色谱分析条件 Kromasil-ODS 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 检测波长 290 nm, 柱温 25 °C, 流动相乙腈(A%)-水(B%)梯度洗脱(0~15 min, 5%→25% A; 15~22 min, 25%→45% A; 22~31 min, 45%→70% A; 31~50 min, 70%→100% A; 50~55 min, 100%→5% A), 流速 1 mL·min⁻¹; 进样量 20 μL。

2.4.2 供试品液的制备 取醋狼毒粉末(过 6 号

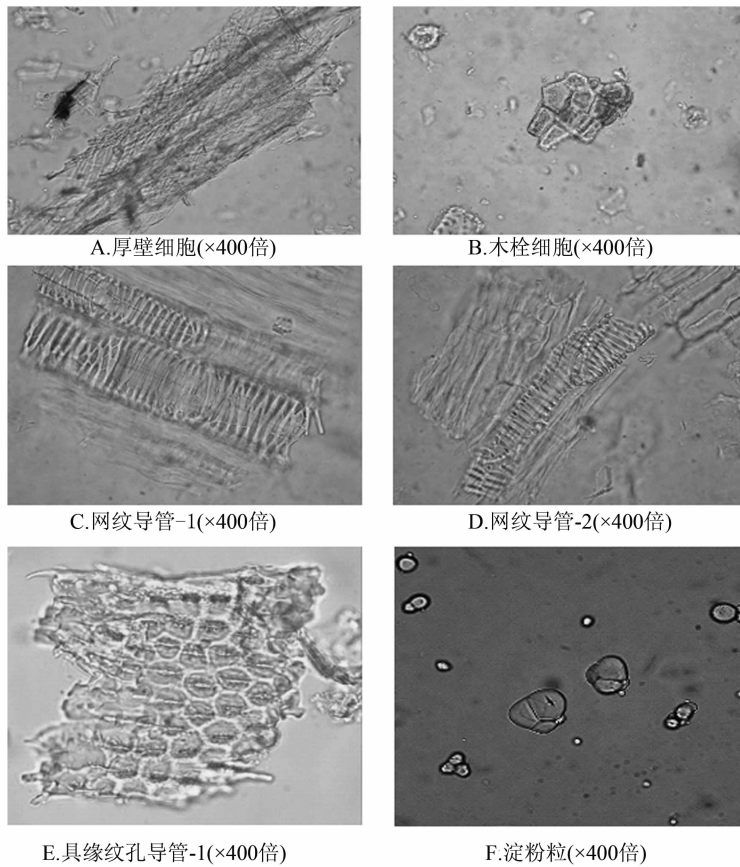


图 1 醋狼毒显微鉴别

筛)约 1 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加甲醇 25 mL,密塞,称定质量,超声处理(功率 250 W,频率 40 kHz)30 min,放冷,再称定质量,用甲醇补足减少的质量,摇匀,滤过,精取续滤液用微孔滤膜(0.45 μm)滤过,取续滤液即得。

2.4.3 对照品液的制备 分别精密称取狼毒乙素 3.00 mg,加甲醇溶解并定容至 50 mL 量瓶中,摇匀,即得狼毒乙素标准储备液。精密量取储备液各 5 mL 至 10 mL 量瓶中,用甲醇定容,即得对照品溶液。

2.4.4 线性关系考察 精密吸取混合对照品溶液 0.2,0.4,0.6,1.0,2.0,3.5,5.0 mL,分别加甲醇定容至 5 mL,各取 20 μL 进样,测定峰面积,以进样量(μg)为横坐标,峰面积为纵坐标绘制标准曲线,结果狼毒乙素的回归方程为 $Y = 4\ 918.8X + 500.03$ ($r = 0.9997$),线性范围 1.20 ~ 30.0 mg·L⁻¹;方法学实验:狼毒乙素精密度 RSD 分别为 0.82%;稳定性试验,RSD 1.26%,表明供试品溶液在 12 h 内稳定;重复性试验 RSD 1.30%;平均回收率($n = 6$)为 100.47% (RSD 1.10%)。

2.4.5 样品含量测定 分别精密吸取对照品溶液 20 μL,醋狼毒供试品溶液 20 μL,注入液相色谱仪,

测定,用外标两点法计算,结果见表 2。

表 2 不同来源醋狼毒中狼毒乙素含量测定($n = 3$)

样品号	样品干重 /g	狼毒乙素	狼毒乙素	均值/%	RSD/%
		含量 /mg·g ⁻¹	百分含量 /%		
1	1.000 7	0.500 1	0.050	0.051	1.38
	1.000 4	0.542 4	0.054		
	1.000 3	0.480 8	0.048		
2	1.001 6	0.396 3	0.040	0.044	2.19
	1.003 2	0.452 9	0.045		
	1.001 9	0.459 0	0.046		
3	1.003 1	0.365 5	0.036	0.037	1.76
	1.003 4	0.400 3	0.039		
	1.002 3	0.349 8	0.035		
4	1.002 6	0.287 7	0.029	0.028	1.34
	1.003 4	0.307 6	0.030		
	1.005 1	0.258 7	0.025		
5	1.005 4	0.431 6	0.043	0.047	1.48
	1.001 4	0.473 7	0.047		
	1.003 5	0.504 7	0.050		

续表 2

No.	样品干重 /g	狼毒乙素 含量 /mg·g ⁻¹	狼毒乙素 百分含量 /%	均值/%	RSD/%
6	1.003 5	0.618 5	0.062	0.064	1.65
	1.001 9	0.666 7	0.066		
	1.005 6	0.645 2	0.064		
7	1.002 3	0.448 4	0.045	0.046	1.27
	1.004 3	0.439 8	0.044		
	1.003 7	0.493 7	0.049		
8	1.001 7	0.304 9	0.030	0.033	0.68
	1.005 9	0.375 1	0.037		
	1.002 2	0.328 4	0.032		
9	1.007 5	0.485 6	0.048	0.050	1.40
	1.008 1	0.503 2	0.050		
	1.003 5	0.517 3	0.051		
10	1.001 9	0.467 4	0.047	0.051	1.96
	1.001 3	0.519 0	0.051		
	1.002 1	0.547 9	0.054		

结果表明,10批醋狼毒饮片的狼毒乙素含量的平均值为0.0451%,其中含量最低的是0.0280%,最高的为0.0640%。

3 讨论

狼毒化学成分研究表明,主要含苯乙酮类及二萜类等成分,其中苯乙酮类中狼毒乙素有较好的活性,因此选用其作为指标性成分进行含量测定。此外实验在该分析条件下还对月腺大戟中狼毒丙素进行了含量测定,因10批结果平均值小于万分之一,故具体研究内容本文未加列出;大戟科中二萜类等成分作为毒效成分报道较多^[9],目前月腺大戟中此类成分的毒性研究还不够深入,炮制前后发生如何的变化尚待进一步研究^[12],故本文对该类成分的质量标准暂未列入。

分别考察了常温条件(25℃)和低温条件(4℃)的自制板和预制板、高湿条件(70%)和低湿条件(30%)的自制板和预制板的TLC鉴别。在上述条件下斑点分离度好,显色清晰,重复性好。

按照2010年版《中国药典》一部醇溶性浸出物测定方法项下热浸法,选择50%,70%,95%体积分

数作为提取溶剂,对样品的醇溶性浸出物提取溶剂进行考察,结果显示,70%乙醇浸出物含量最高,即浸出比较完全,故选用70%乙醇作为醇浸出物溶剂。

上限标准按平均量上浮20%制订,建议拟定醋狼毒饮片的水分不得超过9.12%,总灰分不得超过6.50%,酸不溶性灰分不得超过1.09%。下限标准按平均量下浮20%制订,确定醇浸出物不少于7.70%(稀乙醇)。狼毒乙素含量不得少于0.038%。

[参考文献]

- [1] 徐树楠,朱占民.神农本草经[M].石家庄:河北科学技术出版社,1994:131.
- [2] 中医辞典编辑委员会.简明中医辞典[M].北京:人民卫生社,1982:253.
- [3] 国家药典委员会.中华人民共和国药典.一部[S].北京:中国医药科技出版社,2010:269.
- [4] 颜秉强,张永清.月腺大戟研究进展[J].山东中医药大学学报,2008,32(5):432.
- [5] 曹新伟,冯卫生.狼毒的化学成分研究进展[J].河南中医学院学报,2004,19(11):81.
- [6] 张涵庆.月腺大戟根中有效成分的研究[J].植物学报,1987,29(4):429.
- [7] 刘文燊,何风雷,阮子塘,等.狼毒大戟二萜内酯对人癌细胞体外抑制作用的研究[J].中药材,2000,23(10):623.
- [8] Shi H M, William S I, Zhu H X, et al. Cytotoxic diterpenoids from the roots of *Euphorbia ebacteolata* [J]. *Planta Med*, 2005, 71(4): 3492.
- [9] 宿树兰,丁安伟,段金廛.大戟二萜醇酯类成分及其毒效关系研究进展[J].世界科学技术——中医药现代化,2007,9(4):67.
- [10] 汪兰云,庄果,张永鑫,等.醋狼毒炮制工艺研究[J].南京中医药大学学报,2012,28(3):265.
- [11] 李媛,张丽,单鸣秋,等.正交试验优选甘遂醋制最佳工艺[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(7):4.
- [12] 邱韵紫,郁红礼,吴皓.大戟科大戟属根类中药的毒性研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(23):259.

[责任编辑 顾雪竹]