

苗药铁筷子不同炮制品中4种成分含量及毒性的比较研究[△]

王雪^{1,2,3*}, 王丽^{1,2}, 廖秀^{1,2}, 王海波⁴, 杨娟^{1,2}, 李齐激^{1,2}, 杨小生^{1,2#}[1. 贵州医科大学省部共建药用植物功效与利用国家重点实验室, 贵阳 550014; 2. 贵州省中国科学院天然产物化学重点实验室, 贵阳 550014; 3. 贵州医科大学药学院, 贵阳 550016; 4. 葵花药业集团(贵州)宏奇有限公司, 贵州六盘水 553400]

中图分类号 R927.2; R283.3; R285.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2020)12-1475-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2020.12.13

摘要 目的: 比较苗药铁筷子阴干、烘干、蒸制、炒炭制品中4种成分的含量及其毒性。方法: 采用高效液相色谱法(HPLC)同时测定铁筷子炮制品中东莨菪苷、秦皮苷、东莨菪内酯、异嗪皮啶的含量。色谱柱为Welch-C₁₈, 流动相为乙腈-水(梯度洗脱), 流速为1 mL/min, 检测波长为214 nm, 柱温为30 ℃, 进样量为10 μL。采用改良寇氏法测定铁筷子不同加工炮制品对小鼠的半数致死量(LD₅₀)及其95%置信区间(CI), 并评价其急性毒性。结果: 东莨菪苷、秦皮苷、东莨菪内酯、异嗪皮啶检测质量的线性范围分别为0.019~1.856、0.016~1.616、0.009~0.920、0.006~0.624 μg(R^2 均不低于0.999 5), 精密度、稳定性、重复性试验的RSD均小于2.0%($n=6$); 平均加样回收率分别为104.49%、102.22%、101.45%、99.26%(RSD均小于2%, $n=6$); 阴干、烘干、蒸制、炒炭品中, 东莨菪苷含量分别为1.119 0%、0.904 3%、1.068 4%、0.036 4%, 秦皮苷含量分别为0.867 8%、0.453 9%、0.423 7%、0.020 5%, 东莨菪内酯含量分别为0.077 1%、0.155 5%、0.084 4%、0.290 8%, 异嗪皮啶含量分别为0.110 2%、0.202 1%、0.208 1%、0.249 4%; 4种炮制品的LD₅₀分别为4 118.13、3 733.36、1 643.61、>10 000 mg/kg, 95%CI分别为(3 748.87, 4 523.76)、(3 422.16, 4 072.86)、(1 520.90, 1 776.23)、(>10 000)mg/kg。结论: HPLC法重复性、精密度较好, 可用于同时测定铁筷子不同炮制品中4种成分的含量; 不同炮制品中4种成分均有所差异, 2个糖苷类毒性成分的含量明显下降; 4种炮制品均为低毒或无毒。

关键词 铁筷子; 炮制; 含量; 急性毒性; 糖苷类成分; 小鼠

Comparative Study on the Contents of Four Compounds from Different Processed Products of Miao Medicine *Chimonanthus nitens* and Its Toxicity

WANG Xue^{1,2,3}, WANG Li^{1,2}, LIAO Xiu^{1,2}, WANG Haibo⁴, YANG Juan^{1,2}, LI Qiji^{1,2}, YANG Xiaosheng^{1,2}[1. State Key Laboratory for Efficacy and Utilization of Medicinal Plants, Guizhou Medical University, Guiyang 550014, China; 2. Guizhou Provincial Key Laboratory for Natural Product Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Guiyang 550014, China; 3. College of Pharmacy, Guizhou Medical University, Guiyang 550016, China; 4. Sunflower Pharmaceutical Group (Guizhou) Hongqi Co., Ltd., Guizhou Liupanshui 553400, China]

ABSTRACT OBJECTIVE: To compare the contents of 4 components and toxicity from Miao medicine *Chimonanthus nitens* samples after drying in the shade, oven drying, steam, charring. METHODS: The contents of scopolin, fraxin, scopoletin and isofraxin were simultaneously determined by HPLC. The separation was performed on Welch-C₁₈ column with mobile phase consisted of acetonitrile-water (gradient elution) at the flow rate of 1 mL/min. The detection wavelength was set at 214 nm, and column temperature was 30 ℃, and the sample size was 10 μL. Modified Karber method was used to determine the LD₅₀ and its 95% CI of different processed *C. nitens* to mice and evaluate its acute toxicity. RESULTS: The linear range of scopolin, fraxin, scopoletin and isofraxin were 0.019-1.856, 0.016-1.616, 0.009-0.920, 0.006-0.624 μg (R^2 were all not lower than 0.999 5). RSDs of precision, stability and reproducibility tests were all lower than 2.0% ($n=6$). The average recoveries were 104.49%, 102.22%, 101.45%, 99.26% (all RSDs were lower than 2%, $n=6$). The contents of scopolin were 1.119 0%, 0.904 3%, 1.068 4% and 0.036 4%; those of fraxin were 0.867 8%, 0.453 9%, 0.423 7% and 0.020 5%; those of scopoletin were 0.077 1%, 0.155 5%, 0.084 4% and 0.290 8%; those of isofraxin were 0.110 2%, 0.202 1%, 0.208 1% and 0.249 4% in samples after drying in the shade, oven drying, steam, charring. The LD₅₀ of 4 processed products were 4 118.13, 3 733.36, 1 643.61, >10 000 mg/kg samples; 95% CI were (3 748.87, 4 523.76), (3 422.16, 4 072.86), (1 520.90, 1 776.23), (>10 000)

△ 基金项目: 贵州省高层次创新型人才项目(No.黔科合人才[2015]4027号); 贵阳市科技计划项目(No.筑科合同[2017]8-2号); 贵阳国家高新技术产业开发区管理委员会科技计划项目(No.GX-CX-2018-001)

* 硕士研究生。研究方向: 天然药物化学。E-mail: 1447590915@qq.com

通信作者: 研究员, 博士生导师, 博士。研究方向: 药用植物利用。电话: 0851-83804370。E-mail: gzcnp@sina.cn

mg/kg. CONCLUSIONS: HPLC method is reproducible and precise. It can be used to determine the contents of 4 components in different processed products of *C. nitens*. The contents of 4 components in different processed products, and the contents of glycosides toxicity components are decreased significantly. All the 4 processed products were low or non-toxic.

KEYWORDS *Chimonanthus nitens*; Processing; Content; Acute toxicity; Glycosides; Mice

铁筷子又名山蜡梅、臭蜡梅、岩马桑和野蜡梅等,为蜡梅科植物山蜡梅(*Chimonanthus nitens* Oliv.)的干燥细根,全年均可采挖,洗净,阴干,为常用苗药,主要分布于我国贵州省镇远、龙里和贵阳地区^[1]。该药收载于2003年版《贵州省中药材、民族药材质量标准》《中华本草苗药卷》等专著,具有活血解毒、祛风止痛的功效,可用于治疗疮疖肿毒、跌打损伤、哮喘、劳伤咳嗽、胃痛及风湿痹痛等症^[2-4]。铁筷子化学成分主要有挥发油类、生物碱类、黄酮类、香豆素类等^[5-6],药理作用主要集中在止咳化痰、抑菌、抗炎、镇痛、抗肿瘤、清除自由基等方面^[7-10]。

中药大多对人体有一定的毒副作用,通过炮制可以达到减毒增效的目的。不同的炮制方法,其解毒原理不同,包括使有毒成分减少、利用辅料解毒、使毒性成分发生转变等。中药加工炮制的历史悠久,产地加工是中药材生产的第一个环节,也是最关键的环节,而炮制是药材成为饮片最重要的一步,合理的产地采收加工及炮制方法是影响药材品质的关键^[11]。中药材的产地加工和炮制多遵循古法;时至今日,中药材生产规模加大,其产地加工和炮制也需要产业化,在保证中药材安全有效的前提下,着力提高加工效率。因此,加强对产地加工和炮制技术的研究尤为重要^[12-13]。铁筷子性凉、味辛,有毒,鲜品外用时,可引起皮炎或发泡,服用过量可引起呕吐、腹泻、惊厥,且有中毒案例报道^[14]。铁筷子为民间用药,现能查到的炮制方法仅有在《中国民族药炮制集成》中记载的“取铁筷子片置锅中炒黄,加入蜂蜜拌匀炒干,取出晾干”^[15],但该炮制工艺较复杂,操作技术难度大,故有必要寻找新的加工炮制方法,以提高其生产效率,并保证用药安全。本课题组前期对铁筷子化学成分进行了研究^[16],并通过查阅相关文献证实,东莨菪苷、秦皮苷、东莨菪内酯、异嗪皮啶是其主要活性及质量控制标志成分^[17-22]。基于此,本研究以铁筷子不同炮制品(阴干、烘干、蒸制、炒炭)为对象,通过高效液相色谱法(HPLC)比较不同炮制品中东莨菪苷、秦皮苷、东莨菪内酯、异嗪皮啶等4种成分的含量差异,并探讨其毒性变化,为该苗药的质量控制和临床应用提供依据。

1 材料

1.1 仪器

1260 Infinity型HPLC仪(美国Agilent公司);FA2004N型万分之一电子分析天平(上海菁海仪器仪表有限公

司);SB25-12DT型超声波清洗机(宁波新芝生物科技股份有限公司);OSB-2100型水浴锅(上海爱朗仪器有限公司);101型电热鼓风干燥箱(北京科伟永兴仪器有限公司)。

1.2 药品与试剂

苗药铁筷子阴干品(为专著^[2-3]收录品种,批号:20181108-1,编号:S1)、烘干品(批号:20181108-2,编号:S2)、蒸制品(批号:20181108-3,编号:S3)、炒炭品(批号:20181108-4,编号:S4)均由葵花药业集团(贵州)宏奇有限公司提供,经贵州中医药大学药学院陈德媛教授鉴定为蜡梅科蜡梅属植物山蜡梅(*C. nitens* Oliv.)的根。

东莨菪苷对照品(批号:D-062-180229,纯度:≥98%)、秦皮苷对照品(批号:Q-033-181015,纯度:≥98%)均购自成都瑞芬思生物科技有限公司;异嗪皮啶对照品(批号:110837-201608,纯度:≥98%)、东莨菪内酯对照品(批号:110768-200504,纯度:≥98%)均由中国食品药品检定研究院提供;以0.9%氯化钠溶液作生理盐水用;乙腈为色谱纯,甲醇为分析纯,水为纯净水。

1.3 动物

初成年未交配的SPF级昆明种小鼠,雌雄各半,体质量(20±2)g,购自辽宁长生生物技术股份有限公司,动物生产许可证号:SCXK(辽)2015-0001。明暗周期为12h;所有小鼠均自由饮水和进食,适应性饲养观察1周后开始试验。

2 方法与结果

2.1 铁筷子不同炮制品中4个主成分的含量测定

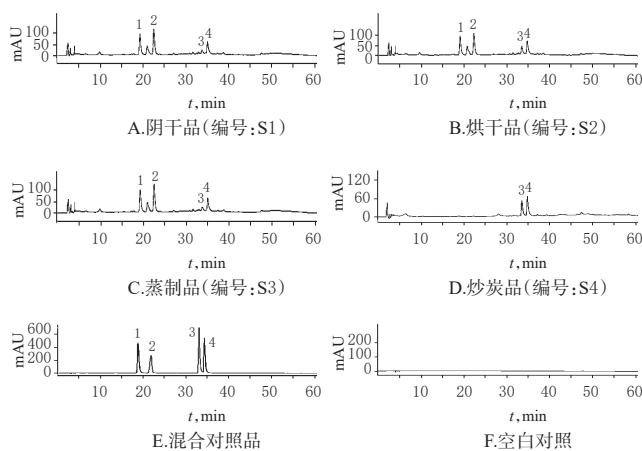
采用HPLC法测定。

2.1.1 色谱条件 色谱柱:Welch-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈(A)-水(B),梯度洗脱(0~10 min, 7% A→9% A; 10~20 min, 9% A→12% A; 20~30 min, 12% A→20% A; 30~40 min, 20% A→30% A; 40~50 min, 30% A→55% A; 50~60 min, 55% A→75% A; 60~70 min, 75% A→95% A);流速:1 mL/min;柱温:30 ℃;检测波长:214 nm;进样量:10 μL。

2.1.2 混合对照品溶液的配制 取东莨菪苷、秦皮苷、东莨菪内酯、异嗪皮啶对照品各适量,精密称定,加80%甲醇溶解,制得每1 mL含东莨菪苷0.185 6 mg、秦皮苷0.161 6 mg、东莨菪内酯0.092 0 mg、异嗪皮啶0.062 4 mg的混合对照品溶液,备用。

2.1.3 供试品和空白对照溶液的配制 精密称定“1.2”项下铁筷子不同加工炮制品,粉碎。取上述粉末1 g,置于250 mL圆底烧瓶中,精密加入80%甲醇100 mL,称定质量,回流提取2 h,放冷,再次称定质量,用80%甲醇补足缺失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得供试品溶液。以80%甲醇作为空白对照溶液。

2.1.4 系统适用性考察 精密吸取“2.1.2”项下混合对照品溶液、“2.1.3”项下供试品和空白对照溶液各10 μL,按“2.1.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图,见图1。结果,各待测成分的分度均大于1.5,理论板数以秦皮苷计不小于40 000。



注:1. 东莨菪苷;2. 秦皮苷;3. 东莨菪内酯;4. 异嗪皮啶

Note: 1. scopolin; 2. fraxin; 3. scopoletin; 4. isofraxin

图1 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

2.1.5 线性关系考察 分别取“2.1.2”项下混合对照品溶液2 mL,置于2、5、10、25、50、100、200 mL量瓶中,用80%甲醇稀释至刻度,混匀。取上述溶液各适量,按“2.1.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图,以进样量(x, μg)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归。结果见表1。

表1 4种待测成分的回归方程和线性范围

Tab 1 Regression equation and Linear range of 4 analytes

待测成分	回归方程	R ²	线性范围, μg
东莨菪苷	y=1 942.6x-16.187 0	0.999 5	0.019~1.856
秦皮苷	y=2 875.3x-8.071 8	0.999 7	0.016~1.616
东莨菪内酯	y=4 172.2x-17.978 0	0.999 6	0.009~0.920
异嗪皮啶	y=6 073.0x+3.651 7	0.999 8	0.006~0.624

2.1.6 精密度试验 取“2.1.2”项下混合对照品溶液适量,按“2.1.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果,东莨菪苷、秦皮苷、东莨菪内酯、异嗪皮啶峰面积的RSD分别为0.84%、0.62%、0.52%、0.58%(n=6),表明仪器精密度良好。

2.1.7 稳定性试验 取“2.1.3”项下铁筷子药材阴干品

供试品溶液,分别于室温下放置0、2、4、8、12、24 h时按“2.1.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,东莨菪苷、秦皮苷、东莨菪内酯、异嗪皮啶峰面积的RSD分别为1.39%、1.39%、0.54%、1.84%(n=6),表明供试品溶液在室温下放置24 h内稳定性良好。

2.1.8 重复性试验 取铁筷子药材阴干品粉末适量,按“2.1.3”项下方法平行制备6份供试品溶液,再按“2.1.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并按标准曲线法计算含量。结果,东莨菪苷、秦皮苷、东莨菪内酯、异嗪皮啶含量的RSD分别为0.59%、0.41%、1.37%、0.69%(n=6),表明本方法重复性良好。

2.1.9 加样回收率试验 精密称取已知含量铁筷子药材阴干品粉末0.5 g,共6份,加入与已知含量等量的东莨菪苷、秦皮苷、东莨菪内酯、异嗪皮啶对照品,按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算加样回收率,结果见表2。

表2 加样回收率试验结果(n=6)

Tab 2 Results of recovery tests(n=6)

待测成分	样品, g	已知含量, mg	加入量, mg	测得量, mg	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %
东莨菪苷	0.500 1	5.665 0	5.336 0	11.221 0	104.12	104.49	0.58
	0.499 9	5.662 7	5.336 0	11.246 2	104.64		
	0.500 0	5.663 9	5.336 0	11.184 4	103.46		
	0.499 8	5.661 6	5.336 0	11.246 7	104.67		
	0.500 1	5.665 0	5.336 0	11.263 7	104.92		
	0.500 1	5.665 0	5.336 0	11.274 0	105.12		
秦皮苷	0.500 1	4.318 1	4.080 0	8.456 0	101.42	102.22	1.41
	0.499 9	4.316 4	4.080 0	8.603 2	105.07		
	0.500 0	4.317 2	4.080 0	8.459 5	101.55		
	0.499 8	4.315 5	4.080 0	8.463 0	101.65		
	0.500 1	4.318 1	4.080 0	8.492 3	102.31		
	0.500 1	4.318 1	4.080 0	8.452 9	101.34		
东莨菪内酯	0.500 1	0.333 4	0.351 0	0.685 0	100.17	101.45	1.64
	0.499 9	0.333 3	0.351 0	0.689 8	101.57		
	0.500 0	0.333 3	0.351 0	0.681 6	99.15		
	0.499 8	0.333 2	0.351 0	0.688 7	101.28		
	0.500 1	0.333 4	0.351 0	0.697 2	103.65		
	0.500 1	0.333 4	0.351 0	0.694 5	102.88		
异嗪皮啶	0.500 1	0.510 4	0.546 0	1.064 1	101.41	99.26	1.22
	0.499 9	0.510 2	0.546 0	1.055 2	99.82		
	0.500 0	0.510 3	0.546 0	1.051 8	99.18		
	0.499 8	0.510 1	0.546 0	1.048 2	98.55		
	0.500 1	0.510 4	0.546 0	1.047 2	98.32		
	0.500 1	0.510 4	0.546 0	1.047 0	98.28		

2.1.10 样品含量测定 精密称取“1.2”项下铁筷子不同炮制品各适量,粉碎,按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1.1”项下色谱条件进行测定,记录峰面积并按标准曲线法计算各样品中4种成分的含量。每样品平行操作3次。结果,与阴干品比较,烘干品、蒸制品、炒炭品中东莨菪苷、秦皮苷含量均下降,而东莨菪内酯、异嗪

皮啉含量均升高;炒炭品中4种成分含量的变化较明显,详见表3。

表3 各成分含量测定结果($n=3, \%$)

Tab 3 Results of content determination of various constituents($n=3, \%$)

样品	东莨菪苷	秦皮苷	东莨菪内酯	异喹啉啉
阴干品	1.119 0	0.867 8	0.077 1	0.110 2
烘干品	0.904 3	0.453 9	0.155 5	0.202 1
蒸制品	1.068 4	0.423 7	0.084 4	0.208 1
炒炭品	0.036 4	0.020 5	0.290 8	0.249 4

2.2 铁筷子不同炮制品急性毒性实验

2.2.1 小鼠急性毒性预实验 根据《食品安全国家标准急性经口毒性试验》^[23]进行实验,药物剂量参考文献方法^[24-25]。取昆明小鼠130只,随机分为空白组,阴干1、2、3组,烘干1、2、3组,蒸制1、2、3组,炒炭1、2、3组,每组10只,雌、雄各半。禁食不禁水12 h后,空白组小鼠灌胃生理盐水0.4 mL/10 g;各给药组小鼠单次灌胃相应药物,组间剂量比为1:0.5。给药后,常规饲养,连续观察7 d,记录各组小鼠死亡情况,结果见表4。由表4可见,阴干、烘干、蒸制组铁筷子引起昆明小鼠100%死亡的剂量(D_m 值)分别为6 000、6 000、2 353 mg/kg;当给药剂量>10 000 mg/kg时,炒炭组小鼠未出现死亡。

表4 小鼠灌胃铁筷子不同炮制品的急性毒性预试验结果

Tab 4 Results of acute toxicity pre-test in mice after intragastric administration of different processed *C. nitens*

组别	剂量,mg/kg	动物数,只	死亡数,只	死亡率, %
空白组(生理盐水)		10	0	0
阴干1组	1 500	10	0	0
阴干2组	3 000	10	2	20
阴干3组	6 000	10	10	100
烘干1组	1 500	10	0	0
烘干2组	3 000	10	1	10
烘干3组	6 000	10	10	100
蒸制1组	600	10	0	0
蒸制2组	1 200	10	1	10
蒸制3组	2 353	10	10	100
炒炭1组	2 500	10	0	0
炒炭2组	5 000	10	0	0
炒炭3组	10 000	10	0	0

2.2.2 铁筷子不同炮制品急性毒性实验 选取小鼠240只,随机分为空白组、阴干1~7组、烘干1~7组、蒸制1~6组、炒炭1~3组,每组10只,雌雄各半。根据预试验中阴干、烘干、蒸制组铁筷子引起昆明小鼠100%死亡的剂量,参考文献^[24-25]及按改良寇氏法^[26]设置药物剂量,阴干组、烘干组、蒸制组组间剂量比值确定为1.0:0.85;炒炭组在预试验中未出现死亡,故将该组组间剂量比值确定为1.0:0.5。禁食不禁水12 h后,空白组小鼠灌胃生理盐水0.4 mL/10 g,阴干1~7组小鼠分别单次灌胃

2 263、2 662、3 132、3 685、4 335、5 100、6 000 mg/kg,烘干1~7组小鼠分别单次灌胃 2 263、2 662、3 132、3 685、4 335、5 100、6 000 mg/kg,蒸制1~6组小鼠分别单次灌胃 1 044、1 228、1 445、1 700、2 000、2 353 mg/kg,炒炭1~3组小鼠分别单次灌胃 2 500、5 000、10 000 mg/kg。连续观察14 d,记录各组小鼠的死亡情况,结果见表5。根据14 d内各组小鼠死亡率,按改良寇氏法^[26]基本公式(公式①)计算半数致死量(LD_{50});按公式②③计算小鼠 LD_{50} 的95%置信区间(CI)。根据世界卫生组织(WHO)外源性化学物毒性分级标准评价铁筷子不同加工炮制品相对毒性^[23]。

表5 铁筷子不同炮制品的急性毒性实验结果

Tab 5 Results of acute toxicity test of different processed *C. nitens*

组别	剂量,mg/kg	动物数,只	死亡数,只	死亡率, %	存活率, %
空白组(生理盐水)		10	0	0	100
阴干1组	2 263	10	0	0	100
阴干2组	2 662	10	1	10	90
阴干3组	3 132	10	2	20	80
阴干4组	3 685	10	2	20	80
阴干5组	4 335	10	6	60	40
阴干6组	5 100	10	7	70	30
阴干7组	6 000	10	10	100	0
烘干1组	2 263	10	0	0	100
烘干2组	2 662	10	1	10	90
烘干3组	3 132	10	1	10	90
烘干4组	3 685	10	6	60	40
烘干5组	4 335	10	8	80	20
烘干6组	5 100	10	8	80	20
烘干7组	6 000	10	10	100	0
蒸制1组	1 044	10	0	0	100
蒸制2组	1 228	10	1	10	90
蒸制3组	1 445	10	2	20	80
蒸制4组	1 700	10	5	50	50
蒸制5组	2 000	10	9	90	10
蒸制6组	2 353	10	10	100	0
炒炭1组	2 500	10	0	0	100
炒炭2组	5 000	10	0	0	100
炒炭3组	10 000	10	0	0	100

$$LD_{50} = \lg^{-1}[X_m - i(\sum p - 0.5)] \dots\dots\dots \textcircled{1}$$

$$FL = \lg^{-1}(\lg LD_{50} \pm 1.96 \times S_{s50}) \dots\dots\dots \textcircled{2}$$

$$S_{s50} = i \times [(\sum pq) / n]^{1/2} \dots\dots\dots \textcircled{3}$$

式中, X_m 表示最大剂量组剂量的对数, i 表示相邻两组给药高剂量与低剂量之比的对数, p 表示各组小鼠的死亡率(用小数表示), $\sum p$ 表示各组小鼠死亡率的总和,FL是 LD_{50} 的95%CI, S_{s50} 是 LD_{50} 的标准误, q 表示每组小鼠的存活率, n 表示每组小鼠数。

结果,铁筷子阴干、烘干、蒸制、炒炭品的 LD_{50} 分别为4 118.13、3 733.36、1 643.61、>10 000 mg/kg,与阴干品比较,烘干、蒸制处理后,铁筷子的毒性略增加,但都属于低毒;而炒炭后,铁筷子为实际无毒,详见表6。

表6 铁筷子不同炮制品的LD₅₀、95%CI和毒性分级Tab 6 Results of LD₅₀, 95% CI, acute toxicity group of Processed *C. nitens*

炮制品	LD ₅₀ ,mg/kg	95%CI,mg/kg	毒性分级(WHO)
阴干品	4 118.13	3 748.87,4 523.76	低毒
烘干品	3 733.36	3 422.16,4 072.86	低毒
蒸制品	1 643.61	1 520.90,1 776.23	低毒
炒炭品	>10 000	>10 000	实际无毒

3 讨论

3.1 提取方法与色谱条件的选择

本研究采用超声、加热回流进行提取,并考察了不同体积分数甲醇的提取效果。结果发现,以80%甲醇加热回流提取2 h时,4种待测成分的提取率均较高。本研究对不同流动相(乙腈-水、乙腈-0.1%甲酸水溶液、乙腈-0.1%磷酸水溶液、甲醇-水)的分离效果进行考察。结果发现,采用乙腈-水进行梯度洗脱时,各待测成分的分度良好,峰形较佳。另外,将样品进行全波长扫描,最终选择214 nm作为检测波长。

3.2 铁筷子经不同方法炮制后4种成分含量的变化

铁筷子阴干、烘干、蒸制、炒炭品中东莨菪苷、秦皮苷、东莨菪内酯、异嗪皮啶含量有所不同。与阴干品比较,烘干、蒸制、炒炭品中东莨菪苷、秦皮苷含量均有不同程度下降,东莨菪内酯、异嗪皮啶含量均有所升高。其中,以炒炭法含量变化最为明显,东莨菪苷下降96.75%,秦皮苷下降97.64%,东莨菪内酯增加277.17%,异嗪皮啶增加126.32%。研究显示,单糖苷的热稳定性差,经过加工炮制(如烘干、蒸制、炒炭等)后单糖苷键会发生断裂,苷含量会降低^[27]。东莨菪苷、秦皮苷单糖苷,加工炮制后,含量降低。东莨菪内酯是东莨菪苷的苷元,经加工炮制后苷键断裂,苷元增加;而异嗪皮啶含量增加,可能是由于秦皮苷发生苷键断裂后接上了甲基有关。

3.3 炮制对铁筷子急性毒性的影响

根据WHO外源性化学物毒性分级标准,铁筷子阴干品、烘干品、蒸制品属于低毒,而炒炭品属于实际无毒。有文献报道,东莨菪苷对神经细胞具有一定毒性,且随着剂量增加而增强^[17];秦皮苷可致镇静、惊厥、昏迷,甚至呼吸麻痹而死^[19]。炒炭后铁筷子毒性降低或与糖苷类的含量有一定关联,但具体原因有待进一步研究。

综上所述,本研究建立的HPLC法重复性、精密度较好,可用于测定铁筷子不同炮制品中4种成分的含量;与阴干品比较,经烘干、蒸制、炒炭后,铁筷子中4种成分含量有所变化,2个糖苷类毒性成分含量明显下降;炒炭品无毒。

参考文献

- [1] 钟琛聪,冯育林.高效液相色谱指纹图谱结合化学计量学方法评价苗药铁筷子的质量[J].中国药学杂志,2017,52(21):1944-1947.
- [2] 国家中医药管理局《中华本草》编委会.中华本草苗药卷[M].贵阳:贵州科技出版社,2006:457-458.
- [3] 贵州省药品监督管理局.贵州省中药材、民族药材质量标准[M].贵阳:贵州科技出版社,2003:236.
- [4] 唐秀胜,靳风云,章誉,等.HPLC法测定贵州苗药铁筷子中东莨菪内酯的含量[J].贵阳中医学院学报,2015,37(6):24-27.
- [5] 张晶,温泉,徐旭,等.基于UHPLC-QTOF-MS/MS技术的铁筷子中3个香豆素在大鼠体内代谢研究[J].中国中药杂志,2018,43(21):4330-4338.
- [6] 周梦颖,钟琛聪.铁筷子化学成分及药理研究进展[J].食品保健,2018,5(2):288-289.
- [7] 李梦,钱海兵.铁筷子醇提取物对佐剂性关节炎大鼠HIF-1 α 、VEGF和MMP-3表达的影响[J].中国药理学通报,2016,32(9):326-327.
- [8] HUANG WP, WEN ZQ, WANG MM, et al. Anticomplement and antitussive activities of major compound extracted from *Chimonanthus nitens* Oliv. leaf[J]. *Biomedical Chromatography*, 2020, 34(2):1-12.
- [9] SUN Q, ZHU JJ, CAO FW, et al. Anti-inflammatory properties of extracts from *Chimonanthus nitens* Oliv. leaf[J]. *PLoS One*, 2017. DOI: 10.1371/journal.pone.0181094.
- [10] 李雪斐,鲁尚德,陈铭,等.苗药铁筷子醇提取物对心肌缺血性大鼠模型病理改变,血脂及TNF- α 、IL-6和IL-18的影响[J].中国民族民间医药,2019,28(22):22-27.
- [11] 马冬妮,李芸,杨秀娟,等.肉苁蓉产地采收加工及炮制方法的研究进展[J].中国药房,2019,30(6):124-126.
- [12] 王亚琦,葛秀允.板蓝根饮片产地加工炮制技术研究[J].中国药房,2018,29(5):656-658.
- [13] 龙全江.论中药材采收与产地加工技术的研究与教育[J].中国中医药信息杂志,2011,18(11):3-4.
- [14] 王锦鸿,陈仁寿.临床实用中药辞典[M].北京:金盾出版社,2005:633.
- [15] 田华咏.中国民族药炮制集成[J].北京:中医古籍出版社,2000:368.
- [16] 王明丽.贵州山蜡梅化学成分研究[D].贵阳:贵阳医学院,2010.
- [17] 李娟.东莨菪苷在制备抑制神经炎症药物中的应用:中国,CN108186657A[P]. 2018-6-22.
- [18] 李在留,李凤兰,郑永唐,等.文冠果种皮中的香豆素类化合物及抗HIV-1活性研究[J].北京林业大学学报,2007,29(5):73-83.
- [19] 方莲花,吕扬,杜冠华.秦皮的药理作用研究进展[J].中国中药杂志,2008,33(23):272-276.
- [20] 褚子璇,卢敏,熊山.东莨菪内酯的药理活性及药代动力

不同淫羊藿羊脂油烘制品的HPLC指纹图谱建立、多元统计分析 及烘制工艺优化[△]

李园^{1,2*}, 李秀丽³, 王淑², 王信⁴, 曹广尚⁴, 孙萍⁴, 郭功玲^{4#}(1. 山东中医药大学附属医院生殖与遗传中心, 济南 250011; 2. 山东中医药大学第一临床医学院, 济南 250355; 3. 山东中医药大学附属医院推拿科, 济南 250011; 4. 山东中医药大学附属医院药学部, 济南 250011)

中图分类号 R283.3 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2020)12-1480-07

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2020.12.14

摘要 目的:建立不同淫羊藿羊脂油烘制品的高效液相色谱(HPLC)指纹图谱,并筛选最优烘制工艺。方法:采用HPLC法。以淫羊藿苷为参照,绘制22批样品的HPLC指纹图谱,采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版)》进行相似度评价,确定共有峰。采用SIMCA 14.1统计软件进行聚类分析(HCA)、主成分分析(PCA)、正交偏最小二乘法-判别分析(OPLS-DA),以变量投影重要性值大于1为标准,筛选影响淫羊藿羊脂油烘制品质量的差异标志物,并以其为指标经烘制动力学研究筛选烘制工艺。结果:22批样品共有18个共有峰,相似度为0.831~0.991;共指认朝藿定A、朝藿定B、朝藿定C、淫羊藿苷、箭藿苷A、箭藿苷B、宝藿苷I等7个共有峰。22批样品可聚为两类,S19~S22为I类,S1~S18为II类;其中II类又可聚为II a(S15~S18)、II b(S10~S14)、II c(S1~S9)等3类;PCA结果与上述结果一致。OPLS-DA结果显示,淫羊藿苷、箭藿苷B、宝藿苷I为影响淫羊藿羊脂油烘制质量的差异标志物。动力学研究结果显示,淫羊藿苷在180℃烘制25 min或190℃烘制20 min,宝藿苷I在180℃烘制30 min或190℃烘制15 min,箭藿苷B在210℃烘制18 min时含量达到最高,根据上述结果最终确定最优烘制工艺为180℃烘制25~30 min或190℃烘制15~20 min。结论:所建指纹图谱方法稳定、可靠,重复性好,多元统计分析可用于反映淫羊藿在不同烘制条件下化学成分的变化情况及初步筛选烘制工艺。

关键词 淫羊藿;羊脂油烘制;高效液相色谱法;指纹图谱;多元统计分析;烘制工艺优化

Establishment of HPLC Fingerprint, Multivariate Statistical Analysis and Processing Technology of Different Suet Oil-baked *Epimedium brevicornum*

LI Yuan^{1,2}, LI Xiuli³, WANG Shu², WANG Xin⁴, CAO Guangshang⁴, SUN Ping⁴, GUO Gongling⁴(1. Center for Reproduction and Genetics, the Affiliated Hospital of Shandong University of TCM, Jinan 250011, China; 2. First Clinical Medical College, Shandong University of TCM, Jinan 250355, China; 3. Dept. of Massage, the Affiliated Hospital of Shandong University of TCM, Jinan 250011, China; 4. Dept. of Pharmacy, the Affiliated Hospital of Shandong University of TCM, Jinan 250011, China)

学研究进展[J]. 化学研究, 2019, 30(4): 434-440.

- [21] TAN T, LOU Y, ZHONG CC, et al. Comprehensive profiling and characterization of coumarins from roots, stems, leaves, branches, and seeds of *Chimonanthus nitens* Oliv. using ultra-performance liquid chromatography quadrupole-time-of-flight mass spectrometry combined with modified mass defect filter[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2017. DOI: 10.1016/j.jpba.2017.04.016.
- [22] 黄文平, 温芝琪, 王萌萌, 等. 山腊梅叶中8种成分含量测定及主成分分析[J]. *中药新药与临床药理*, 2018, 29(6):

799-803.

- [23] 国家卫生计生委. 食品安全国家标准急性经口毒性试验[S]. 2014-12-24.
- [24] 周勇, 温佳颖, 林琪胜, 等. 千里光超微粉的急性毒性及其镇痛机制研究[J]. *中兽医医药杂志*, 2019, 38(4): 46-49.
- [25] 李亭, 黄诗淇. 急性经口毒性试验方法研究进展[J]. *吉林化工学院学报*, 2019, 36(1): 11-14.
- [26] 黄小秋, 杨其波, 黄小玉, 等. 四数九里香不同提取液的急性毒性试验研究[J]. *中国民族民间医药*, 2017, 26(21): 33-35.
- [27] 岳超, 高杰, 石上梅, 等. HPLC测定地黄炮制前后3种苷类物质的含量[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2015, 21(4): 71-74.

[△] 基金项目: 山东省中医药科技发展计划项目(No. 2017-082)

* 主治医师, 博士研究生。研究方向: 补肾中药在辅助生殖中的干预机制。电话: 0531-68617803。E-mail: liyuan2067@163.com

通信作者: 主任药师。研究方向: 中药炮制及中药制剂质量控制。电话: 0531-68617919。E-mail: guogongling@163.com

(收稿日期: 2019-12-19 修回日期: 2020-04-22)

(编辑: 段思怡)